

ENZYMKATALYSIERTE OXIDATION VON  
(+)-ISOLAUDANOSOLIN-METHOBROMID UND  
(+)-O-DESMETHYL-MAGNOCURARIN-BROMID

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
im Fachbereich Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Barbara Köhne  
aus Gießen/L

Berlin 1971

1972



ENZYMKATALYSIERTE OXIDATION VON  
(+)-ISOLAUDANOSOLIN-METHOBROMID UND  
(+)-O-DESMETHYL-MAGNOCURARIN-BROMID

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
im Fachbereich Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Barbara Köhne  
aus Gießen/L

Berlin 1971

1. Referent: Prof. Dr. K. -H. Frömming
2. Referent: Prof. Dr. G. Schenck



Tag der mündlichen Prüfung: 20.3.1972

Tag der Promotion:

Die vorliegende Arbeit wurde im Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin auf Anregung und unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. K.-H. Frömming durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof.Dr.K.-H. Frömming besonders für seine stete Bereitschaft zur Diskussion aller Probleme, die sich im Zusammenhang mit dieser Arbeit ergaben.



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

# INHALTSVERZEICHNIS

## THEORETISCHER TEIL

|                                                                                | Seite |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. Einleitung                                                                  | 5     |
| 2. Problemstellung                                                             | 11    |
| 3. Oxidationsenzyme                                                            | 12    |
| 4. Theoretische Überlegungen über den Ablauf<br>enzymkatalysierter Oxidationen | 16    |
| 4.1. Oxidation von Isolaudanosolin-methobromid                                 | 16    |
| 4.2. Oxidation von O-Desmethyl-magnocurarin-bromid                             | 24    |
| 5. Synthese von Isolaudanosolin-methobromid                                    | 29    |
| 6. Synthese von O-Desmethyl-magnocurarin-bromid                                | 35    |
| 7. Enzymkatalysierte Oxidation von<br>Isolaudanosolin-methobromid              | 36    |
| 7.1. Phenoloxidase                                                             | 36    |
| 7.2. Laccase                                                                   | 46    |
| 7.3. Peroxidase/Wasserstoffperoxid                                             | 46    |
| 8. Enzymkatalysierte Oxidation von<br>O-Desmethyl-magnocurarin-bromid          | 51    |
| 8.1. Phenoloxidase                                                             | 51    |
| 8.2. Laccase                                                                   | 65    |
| 8.3. Peroxidase/Wasserstoffperoxid                                             | 65    |
| EXPERIMENTELLER TEIL                                                           | 69    |
| Zusammenfassung                                                                | 93    |
| LITERATURVERZEICHNIS                                                           | 96    |



## 1. Einleitung.

Alkaloide vom Typ der Benzyl-tetrahydro-isochinoline werden durch oxidative Kondensation phenolischer Basen gebildet, ausgehend von Phenylalanin-Derivaten über Dihydro-isochinolin-Zwischenstufen. Entsprechend der Theorie der Phenolkondensation befinden sich die Substituenten in o- oder p-Stellung zum Kondensationsatom. Als Substituenten kommen in der Natur Hydroxyl-, Methoxy- und Methylendioxygruppen vor.

Oxidationsversuche in vitro mit biogeneseähnlichen Oxidationsmitteln, wie Eisen-III-chlorid, Kaliumhexacyanoferrat-III, konnten die Theorie der Phenolkondensation bestätigen<sup>1-4)</sup>.

Oxidationen können sowohl unter inter- als auch intramolekularer Verknüpfung verlaufen. Liegt eine sterische Hinderung nicht vor, erfolgt die kinetisch günstige C-C-Verknüpfung. Hierbei werden o/o- gegenüber o/p- und p/p-Positionen bevorzugt. Sprechen voluminöse Reste oder andere Gründe für eine sterische Hinderung, kann die Kondensation über Ätherbrücken erfolgen. Di-, Tri- und Polymerenbildung ist möglich. Tabelle 1 und Abbildung 1 zeigen die möglichen Kondensationen an einigen typischen Beispielen.

Der Ringstickstoff kann sekundär, tertiär oder quartär vorliegen. Quaternäre Alkaloide wurden relativ spät aus Pflanzen isoliert, da sie mit den konventionellen unpolaren Lösungsmitteln nicht extrahierbar sind.

Die Basizität des Stickstoffs ist bei der chemischen Oxidation häufig ausschlaggebend für das Reaktionsprodukt. FRANCK und SCHLINGLOFF<sup>2)</sup> gelang es erstmalig durch Oxidation des quaternären Laudanosolin-methobromids **8** ein Aporphin **9** zu erhalten (Abb. 2).

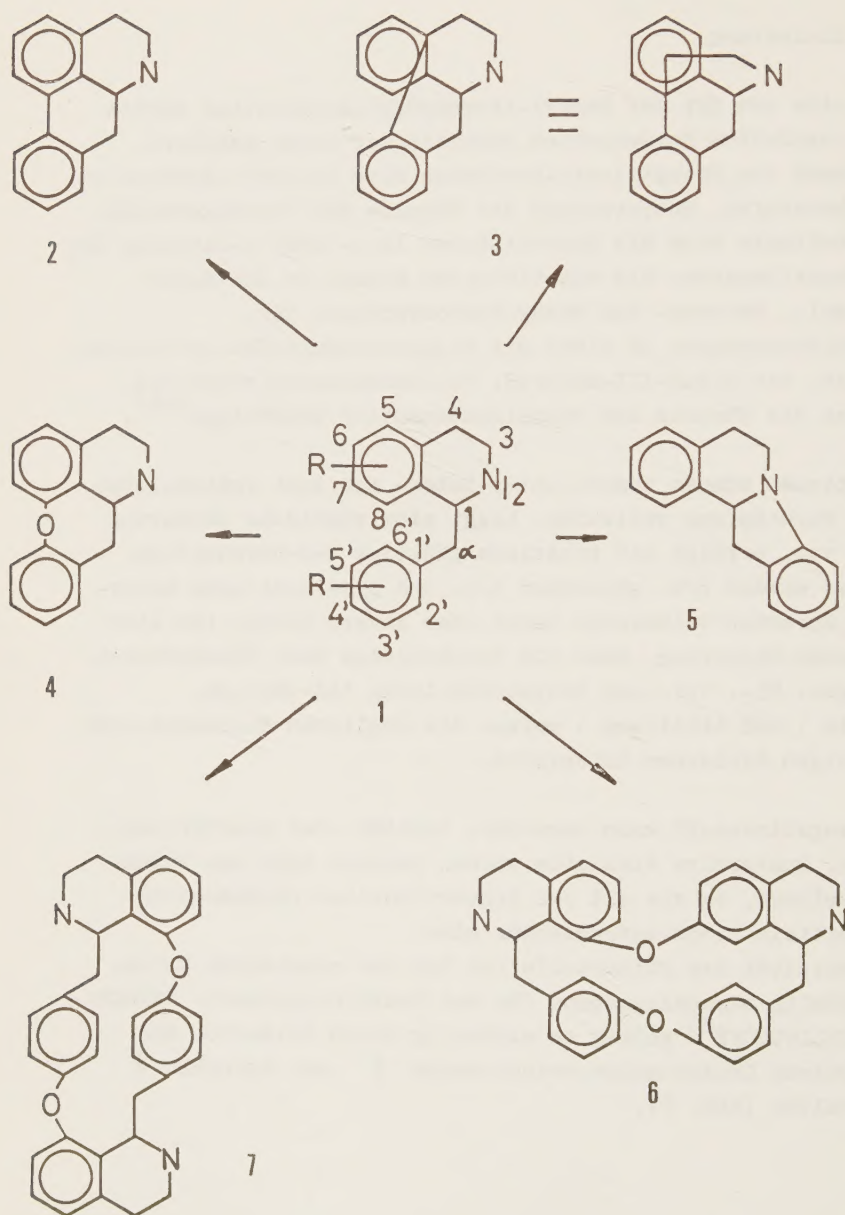


Abb. 1 Reaktionsprodukte bei der Oxidation von 1-Benzyl-tetrahydro-isochinolin 1

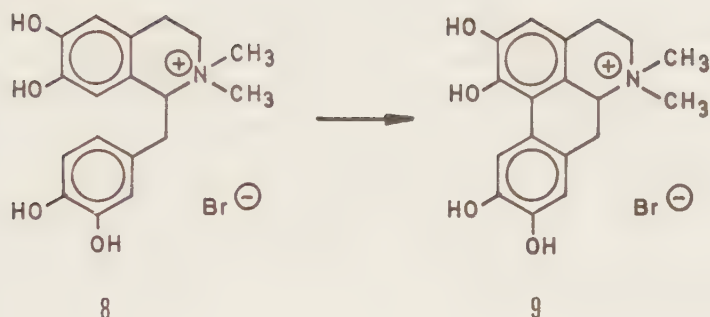


Abb. 2 Oxidation des Laudanosolin-methobromids 8

| Verknüpfung                                                                | Alkaloid-Typ                  | Beispiele                                            |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------------------|
| C <sub>8</sub> -C <sub>2</sub> ,                                           | Aporphin 2                    | Corydin, Boldin, Hernandin,                          |
| C <sub>4a</sub> -C <sub>2</sub> ,                                          | Morphinan 3                   | Flavinin, Salutaridin,                               |
| C <sub>8</sub> -O-C <sub>2</sub> ,                                         | Cularin 4                     | Cularidin, Cularimidin,                              |
| N-C <sub>2</sub> ,                                                         | Pyrrocolin 5                  | Cryptaustolin,                                       |
| C <sub>8</sub> -C <sub>1</sub> ,                                           | 5-Ring-Spiran                 | Pronuciferin, Glaziovine,<br>Crotonosin, Linearisin, |
| AC <sub>8</sub> -O-C <sub>4</sub> B<br>AC <sub>3</sub> -O-C <sub>4</sub> B | Berbamin 6<br>dimer, parallel | Magnolaurin,<br>Berbamin, Magnolin,                  |
| AC <sub>8</sub> -O-C <sub>4</sub> B                                        | Curin 7                       | Chondrocurin                                         |
| AC <sub>4</sub> -O-C <sub>8</sub> B                                        | dimer, antiparall.            | Curin                                                |

Tab. 1 Natürliche, vom 1-Benzyl-tetrahydro-isochinolin 1 durch Oxidation ableitbare Alkaloide.

Als Biosynthesevorstufen spielen quaternäre Basen wahrscheinlich nur eine begrenzte Rolle, da in der Pflanze vorwiegend tertiäre Alkaloide auftreten. Arbeiten von BATTERSBY<sup>5)</sup> untermauern diese Vermutung. Er fand bei Fütterungsversuchen, daß <sup>14</sup>C-markiertes quaternäres N-Methyl-reticulín im Gegensatz zur sekundären und tertiären Verbindung nicht in Morphin eingebaut wird. Ebenfalls als Nachteil könnte sich auswirken, daß nach erfolgter Kondensation die quaternäre Schutzgruppe nur schwer zu entfernen ist.

Quaternäre Aporphine erleiden leicht Hofmann-Eliminierung, bei der sich das stabilere Phenanthrensystem bildet<sup>6)</sup>. So überführten FRANCK und Mitarbeiter<sup>2)</sup> O-Desmethyl-glaucin-jodid **10** unter milden, schwach alkalischen Methylierungsbedingungen in das Phenanthren-Derivat **11** (Abb. 3).

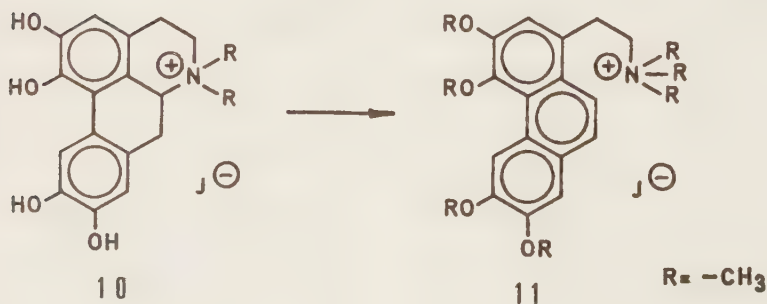


Abb. 3 Hofmann-Eliminierung von O-Desmethyl-glaucin-jodid **10**

In der Natur wurden Alkaloide, die durch Hofmann-Eliminierung quaternärer Aporphine entstanden sein könnten, neben den entsprechenden Aporphinen und Benzyl-tetrahydro-isochinolininen gefunden, wie z.B. in *Thalictrum thunbergii* und *Cryptocaria angulata*<sup>7-9</sup>).

Im Hinblick auf die nachfolgenden enzymatischen Oxidationen soll an einem weiteren Beispiel hervorgehoben werden, daß biosynthetische Reaktionen häufig nicht nach chemischem Muster verlaufen. BARTON<sup>10</sup>) erhielt mit <sup>14</sup>C-markiertem Reticulin 12 anstatt des erwarteten Isoboldin-Derivates 13, welches bei der Oxidation mit Fe<sup>3+</sup> gefunden wurde, eine Umwandlung des Reticulins über das Dienon Salutaridin 14. zum Thebain 15 (Abb. 4).

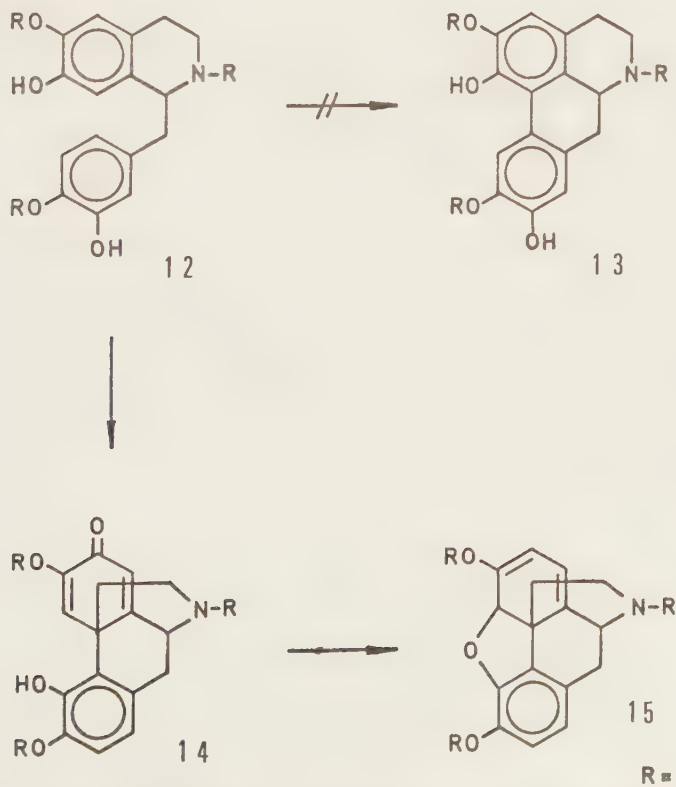


Abb. 4 Biosynthetische Umwandlung des Reticulins zum Thebain

Andererseits beweisen Versuche mit Phenoloxidase und Peroxidase an einfachen Phenolen, daß enzymkatalysierte Oxidationen den chemischen analog verlaufen können. PUMMERER<sup>11)</sup> erhielt bei der nichtenzymatischen Oxidation von p-Kresol 16 Dehydro-p-Kresol und ein Keton 17, dessen Strukturbeweis BARTON<sup>12)</sup> gelang. Die Peroxidase-katalysierte Oxidation führte zu den gleichen Verbindungen<sup>13)</sup>. In einem weiteren Beispiel wurde aus Vanillin mit dem gleichen Enzym Dehydro-vanillin gewonnen<sup>14)</sup>. Es muß jedoch bemerkt werden, daß bei der enzymatischen Oxidation in vitro PUMMERER's Keton als Racemat vorlag. Die Vorgänge in der Pflanzenzelle konnten demnach nicht exakt reproduziert werden (Abb. 5).

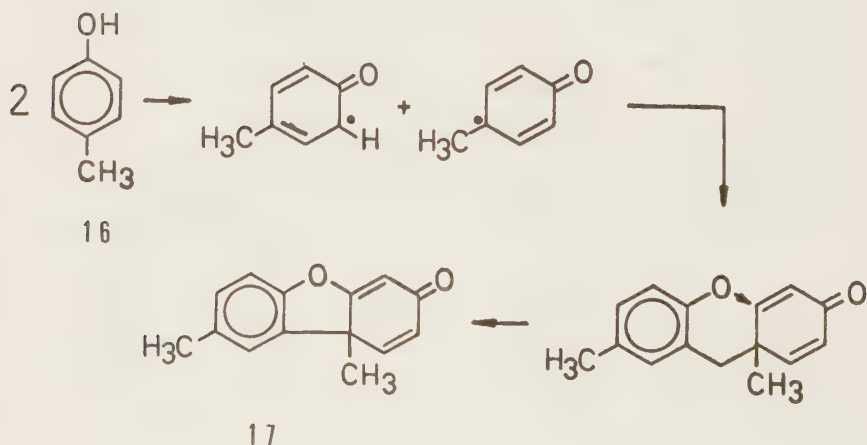


Abb. 5 Oxidation von p-Kresol mit Phenoloxidase  
oder Peroxidase/Wasserstoffperoxid

Die Ausbeuten enzymatischer Versuche in vitro hängen von der Struktur der Phenole, der Löslichkeit und der Stabilität der Reaktionsprodukte sowie der Reaktionsbedingungen (pH etc.) ab.

Phenole, bei denen ein oder zwei reaktive Zentren +M-Substituenten, wie Methoxygruppen, tragen, geben bessere Ausbeuten<sup>15)</sup>.

Eine große Anzahl von Nebenprodukten kann gleichzeitig durch Hydroxylierung, Ringspaltung oder Polymerisation gebildet werden. Isomerenbildungen infolge eingeschränkter Rotation um die C-C-Bindungen erschweren die Identifikation.

## 2. Problemstellung

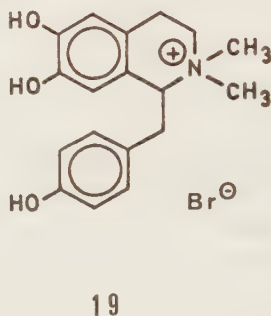
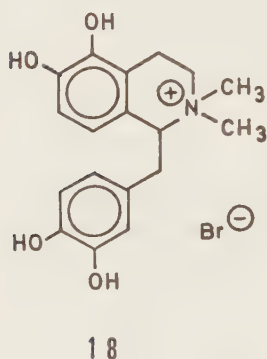
Durch Versuche von BATTERSBY<sup>16)</sup>, NEUBAUER<sup>17)</sup>, RAPOPORT und STERNITZ<sup>18)19)</sup> mit isotopenmarkierten Zwischenstufen konnte die Fähigkeit der Pflanzenzelle bewiesen werden, Aporphinalkaloide durch oxidative Phenolkondensation zu bilden. Biosynthetisch wahrscheinlich ist die katalytische Beteiligung von Enzymen an solchen Oxidationsvorgängen. Untersuchungen von SCHENCK und Mitarbeitern<sup>20)</sup> über den Abbau des Morphins in den Kapseln von Papaver somniferum, Versuche von FRÖMMING<sup>21)</sup> und japanische Arbeiten<sup>22)</sup> legen eine Beteiligung von Oxidasen nahe.

Die für diese Arbeit ausgewählten Enzyme Phenoloxidase (Tyrosinase), Laccase und Peroxidase, sind im Pflanzenreich weit verbreitet und ihre Fähigkeit, oxidative Kondensationen zu katalysieren, ist an Phenolen bewiesen.

In dieser Arbeit sollte in Modellversuchen geprüft werden, ob die genannten Enzyme in vitro die Oxidation quaternärer 1-Benzyl-tetrahydro-isochinoline katalysieren und damit für entsprechende Reaktionen in der Pflanzenzelle verantwortlich gemacht werden können.

Außerdem sollte geprüft werden, ob die bei einer Oxidation entstehenden Reaktionsprodukte identisch sind mit solchen, die bei der chemischen Oxidation unter biogeneseähnlichen Bedingungen erhalten wurden<sup>4)</sup>. Die beiden Alkaloide (+)-Isolaudanoson-

lin-methobromid **18** und (+)-O-Desmethyl-magnocurarinbromid **19** waren besonders geeignet, da ihre Oxidationsprodukte, die unter biogeneseähnlichen Bedingungen erhalten wurden, bekannt waren<sup>4)</sup>.



### 3. Oxidationsenzyme.

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme Phenoloxidase, Laccase und Peroxidase wurden nach folgenden Gesichtspunkten ausgewählt:

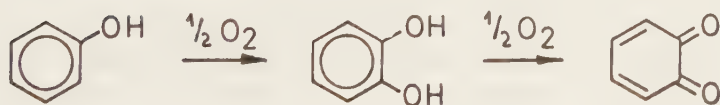
- Ubiquitäres Vorkommen im Pflanzenreich (Phenoloxidase und Peroxidase),
- bevorzugte Oxidation phenolischer Verbindungen,
- mögliche Bildung analoger Reaktionsprodukte.

#### 3.1. Phenoloxidasen (Tyrosinasen).

Es sind kupferhaltige Oxidasen, die nahezu in allen Pflanzen gefunden wurden. Die Gewinnung erfolgt meist aus Kartoffeln oder Pilzen. Phenoloxidasen übertragen Elektronen von dehydrierbaren Substraten auf Sauerstoff und reduzieren diesen zu Wasser.

Zwei Reaktionstypen werden katalysiert:

1. Monophenole werden zunächst zu einem o-Diphenol hydroxyliert und anschließend zum o-Chinon dehydriert, sofern beide ortho-Stellungen der Phenylhydroxylgruppen unsubstituiert sind<sup>23)</sup>. Ausnahmen sind bekannt: Bei Anwesenheit bestimmter phenolischer Substanzen wie Brenzkatechin, 4-Hydroxymethylsäure (p-Cumarsäure) oder 3,4-Dihydroxymethylsäure (Kaffeesäure), die dem Enzym als Substrat dienen, können auch Verbindungen bei Substitution einer ortho-Stellung oxidiert werden<sup>24)25)</sup>. Die genannten Überträgersubstanzen sind ferner in der Lage, die für eine Hydroxylierung notwendige Induktionszeit zu verkürzen oder aufzuheben. Die Fähigkeit zur Hydroxylierung wird als "Cresolase-Aktivität" bezeichnet.
2. O-Diphenole werden zu o-Chinonen oxidiert. ("Catecholase-Aktivität"). Sind voluminöse Substituenten wie Butylgruppen vorhanden, bleibt die Reaktion infolge sterischer Hinderung aus<sup>26)</sup>.



"Cresolase-Aktivität"

"Catecholase-Aktivität"

Als Polyphenoloxidasen werden nach CONN<sup>27)</sup> Enzympräparationen bezeichnet, die während der Reinigung die Fähigkeit des Hydroxylierens weitgehend verloren haben. Solche Präparationen sind nach KEILIN und MANN<sup>28)</sup> gegenüber Diphenolen stark aktiviert, während Monophenole erst nach einer längeren Induktionszeit angegriffen werden<sup>29)</sup> (vgl. Tab. 2). Diese Induktionszeit kann durch Zugabe eines der oben genannten Diphenole aufgehoben werden.

### 3.2. Laccasen.

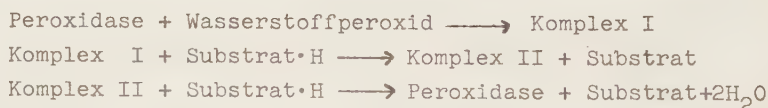
Es handelt sich ebenfalls um Kupferproteide, deren Gewinnung vorwiegend aus dem Milchsaft des chinesischen Lackbaumes, *Rhus vernicifera*, erfolgt. Die katalysierten Reaktionen verlaufen bevorzugt über Radikalmechanismen, deren Zwischenstufen Semichinone darstellen. Während der Reaktion findet ein reversibler Wertigkeitswechsel des Kupfers statt<sup>30)</sup>.

Eine Hydroxylierung von Monophenolen wurde nicht beobachtet. Als Substrate können o- und p-Diphenole dienen. Ob Monophenole oxidiert werden, hängt nach FAHRHAEUS<sup>31)</sup> von der Herkunft des Enzyms ab (vgl. Tab. 2).

### 3.3. Peroxidasen.

In kleineren Mengen wurden Peroxidasen in zahlreichen höheren Pflanzen gefunden. Ihre Gewinnung erfolgt hauptsächlich aus der, mehrere Komponenten mit Peroxidase-Wirkung enthaltenden Meerrettichwurzel<sup>32)</sup>.

Peroxidasen sind Häminproteide. Das Eisenzentralatom ist dreiwertig. Ob ein Valenzwechsel während der Katalyse stattfindet, ist ungewiss. Bei der Substratoxidation werden Protonen frei. Als Wasserstoffakzeptor muß Wasserstoffperoxid zur Verfügung stehen.



Peroxidasen katalysieren die Oxidation von Mono-, Di-, und Polyhydroxyverbindungen. Häufig schließen sich Di- und Polymerisationen an. Eine Hydroxylierung findet normalerweise nicht statt, ist jedoch bei gleichzeitiger Anwesenheit gewisser Endiolen, wie Ascorbinsäure und Dihydroxyfumarsäure, beobachtet worden<sup>33)34)</sup>.

Mögliche Reaktionsmechanismen zeigen SAUNDERS und Mitarbeiter<sup>35)</sup>. Wird die Oxidation durch Bildung freier Radikale eingeleitet, verläuft die Sekundärreaktion nicht-enzymatisch. Findet andererseits die Bildung eines aktivierten Komplexes aus Substrat,

Wasserstoffperoxid und Peroxidase statt, dann ist die Reaktion nicht an das Vorhandensein phenolischer Hydroxylgruppen gebunden<sup>36)</sup>.

Das pH-Optimum ist, neben der Herkunft der Peroxidase, vom Wasserstoffdonator abhängig und liegt im allgemeinen am Neutralpunkt. Die Geschwindigkeit der peroxidatischen Reaktion wird von der Wasserstoffperoxid-Konzentration geregelt (Tab.2).

| Enzym                                         | Monophenole | Diphenole |     |     | Hydroxy-<br>lierung |
|-----------------------------------------------|-------------|-----------|-----|-----|---------------------|
|                                               |             | o-        | m-  | p-  |                     |
| Phenol-oxidase                                | + nR        | + R       | -   | -   | +                   |
| Laccase                                       | + -         | + R       | -   | + R | -                   |
| Peroxida-<br>se/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | + R         | + R       | + R | + R | -                   |

nR: nicht radikalisch verlaufende Reaktion

R: radikalisch

"

"

Tab.2 Schema der durch die Oxidationsenzyme initiierten Oxidationsreaktionen

#### 4. Theoretische Überlegungen über den Ablauf enzymkatalysierter Oxidationen.

Vor der Durchführung der experimentellen Untersuchungen wurden Überlegungen angestellt, auf welchen Wegen theoretisch die Oxidation der beiden 1-Benzyl-tetrahydro-isochinoline **18** und **19** durch die genannten Enzyme zu erwarten ist. Zum Vergleich der Reaktionsprodukte wurden die Ergebnisse herangezogen, die bei der chemischen Oxidation unter biogeneseähnlichen Bedingungen erhalten wurden<sup>2)37)</sup>, da die Bildung gleicher Reaktionsprodukte möglich erschien.

##### 4.1. Oxidation von (+)-Isolaudanosolin-methobromid **18**

###### 4.1.1. Chemische Oxidation. Elektronenakzeptor: Eisen-III-chlorid.

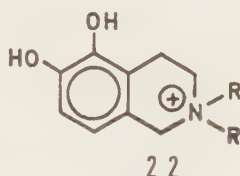
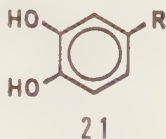
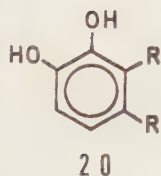
Der Entzug eines Elektrons aus dem Dianion des Isolaudanosolin-methobromids führte zu dem konstellationsisomeren, mesomeren Diradikal **27**. C-C-Verknüpfung des Bissemichinons **28** zu dem Aporphin **26** folgte. Theoretisch sind, aufgrund der verschiedenen Möglichkeiten der Radikalbildung, mehrere Verknüpfungen denkbar. Im Reaktionsprodukt überwiegt jedoch die Substanz mit der stabileren Konstellation und der geringsten sterischen Hinderung (Abb. 9).

###### 4.1.2. Phenoloxidase.

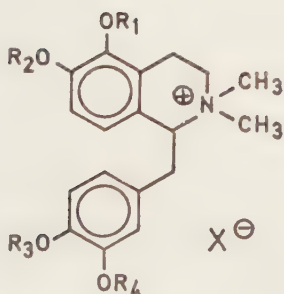
Aufgrund der "Catecholase-Aktivität" kann bei der Oxidation von Isolaudanosolin-methobromid o-Chinonbildung erwartet werden, wobei nicht sicher ist, ob der Angriff des Enzyms zuerst am Benzylteil oder an der diphenolischen Gruppierung des Tetrahydroisochinolins erfolgt. Betrachtet man die beiden Aromaten als substituierte Brenzkatechine der nachfolgenden Strukturen **20** und **21**, so sollte, ohne Berücksichtigung sterischer Einflüsse, in beiden Fällen Oxidation zu o-Chinonen möglich sein (Abb. 6).

Zur Klärung der Frage des Enzymangriffs müßte der Verlauf der enzymatischen Oxidation der entsprechenden Verbindungen **23** und **24** untersucht werden. Ebenso wäre in diesem Zusammen-

hang die Oxidation von 5.6-Dihydroxy-1.2.3.4-tetrahydro-  
isochinolin **22** von Interesse. Bisher sind solche Unter-  
suchungen in der Literatur nicht beschrieben.



R = Substituent



$R_1 = R_2 = -CH_3$  23

$R_3 = R_4 = -OH$

$R_1 = R_2 = -OH$  24

$R_3 = R_4 = -CH_3$

Abb. 6

Der Enzymangriff wird möglicherweise durch sterische Faktoren  
bestimmt. Zu diesem Ergebnis kamen FRÖMMING und DRESCHER<sup>38)</sup>  
bei ihren Untersuchungen über die enzymatische Oxidation von  
Hämatoxylin **25** zu Hämatein. Sie fanden einen bevorzugten  
Angriff des Enzyms an der o-Dihydroxygruppierung an Ring A,

während die nicht-enzymatische Oxidation bevorzugt an Ring D ansetzte (Abb. 7).

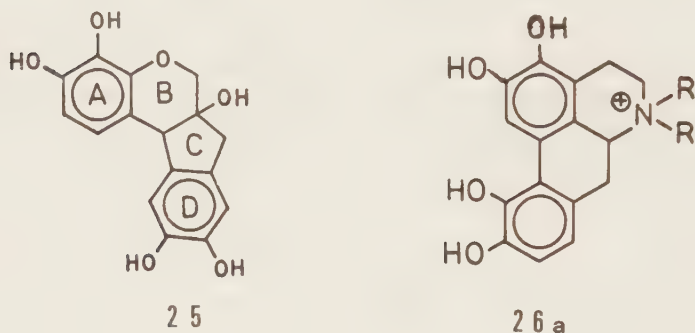


Abb. 7

Die Phenoloxidase-katalysierte Dehydrierung des Isolaudanosolinmethobromids läuft wahrscheinlich über einen Ionenmechanismus ab<sup>2)39)40)</sup>. Danach würde zunächst eine der beiden Brenzkatechingruppen zum o-Chinon oxidiert. Dieses wird dann unter intramolekularer nucleophiler Anlagerung eines Phenolations zum Aporphin **26** kondensiert. Dabei ist eine p/p-Verknüpfung zwischen den Atomen C<sub>8</sub> und C<sub>6</sub>, zu erwarten (Abb. 8). Das Maximum der UV-Absorption würde dann infolge des planaren Diphenylsystems des Aporphins **26** im Bereich über 284 nm liegen (Abb. 22, S. 42).

Eine C<sub>8</sub>-C<sub>2</sub>, - (p/o-) Verknüpfung hätte ein sterisch und energetisch ungünstigeres Aporphin mit stärker verdrilltem Diphenylsystem **26a** zur Folge. In den natürlich vorkommenden Alkaloiden liegt allerdings diese Verknüpfung vor (Tab. 1). Das Maximum der UV-Absorption liegt dann zwischen 280 und 284 nm (Abb. 22, S. 42).

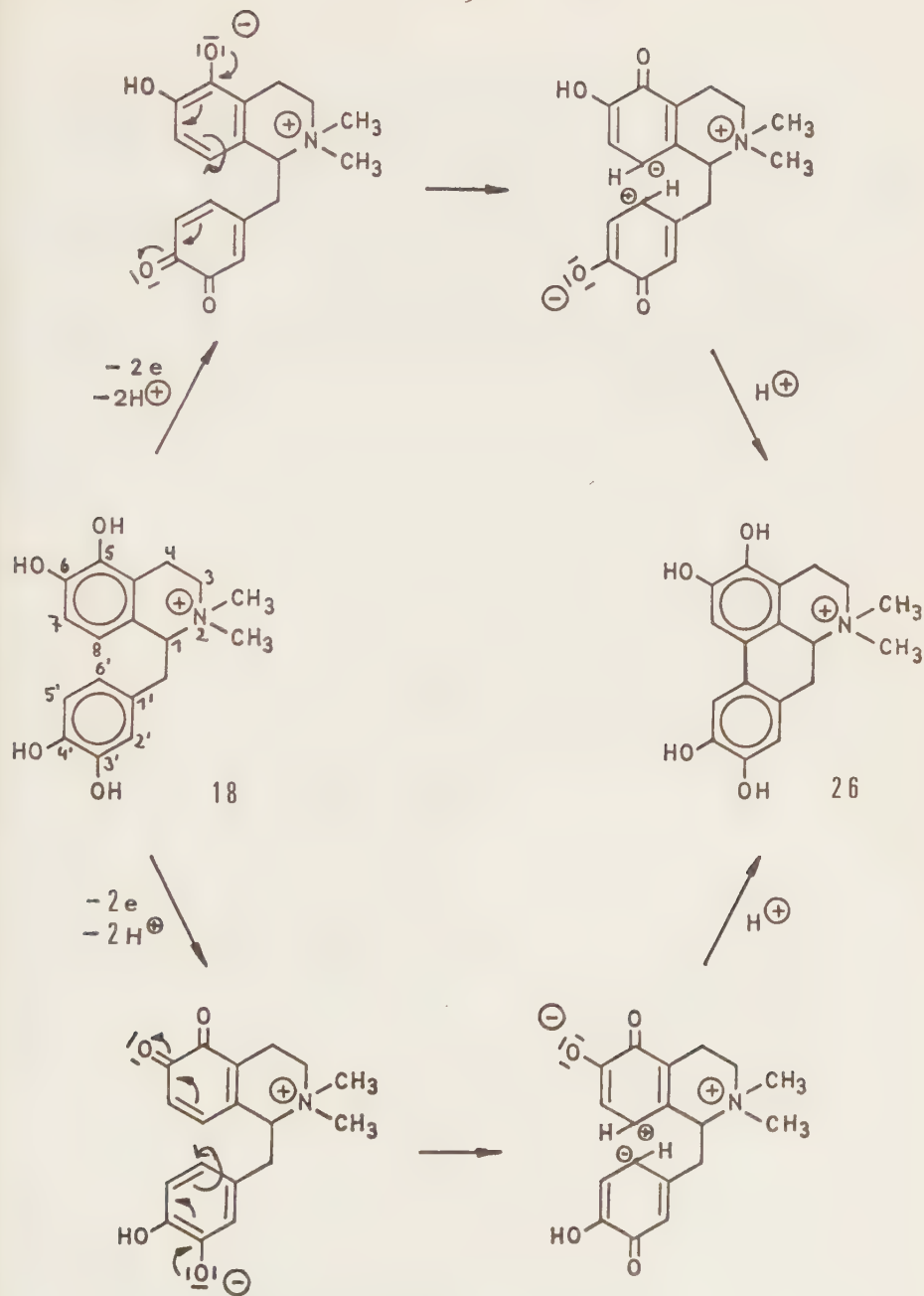


Abb. 8 Oxidationsschema von Isolaudanosolin-methobromid 18  
nach einem Ionenmechanismus

#### 4.1.3. Laccase und Peroxidase/Wasserstoffperoxid.

In beiden Systemen sollte, wie oben beschrieben, vorzugsweise die Bildung des Aporphins mit planarem Diphenylsystem **26** erfolgen. Die Reaktionen würden hier jedoch vorwiegend über Radikalmechanismen verlaufen, wie sie für Laccase- und Peroxidaserreaktionen typisch sind.

Elektronenentzug führt danach zu dem Diradikal **27**, das in der mesomeren Bissemichinonform **28** zum Aporphin **26** cyclisiert werden kann (Abb. 9).

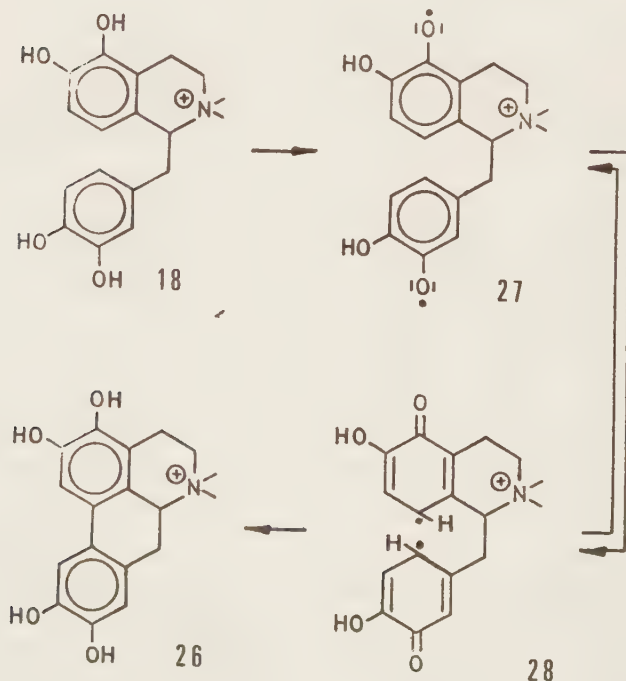


Abb. 9 Oxidationsschema von Isolaudanosolin-methobromid **18** nach einem Radikalmechanismus

Theoretisch ist auch die o/o-Bindung zwischen  $C_{4a}$  und  $C_2$ , zu den Morphinan-Derivaten **29a** und **29b** in Erwägung zu ziehen (Abb. 10). Voraussetzung hierfür ist jedoch, daß die Reaktion zum o-Chinon unterbleibt. Die Reaktion müßte auf der Radikalstufe stehen bleiben und hier die Verknüpfung erfolgen. TIETZE<sup>41)</sup> gelang es, die Bildung der o-Chinon-Zwischenstufe durch Komplexierung der Brenzkatechingruppen zu verhindern. Er verwendete dazu Eisen-III-chlorid-Lösung in hoher Konzentration. Die Reaktion verlief, wie er nachweisen konnte, über o-Semichinon-Radikal-Komplexe. Es ist möglich, daß in der Pflanze die Dehydrierung des Isolaudanosolin-methobromids zu Morphinan-Derivaten ebenfalls über die intermediäre Bildung eines Chelats erfolgt.

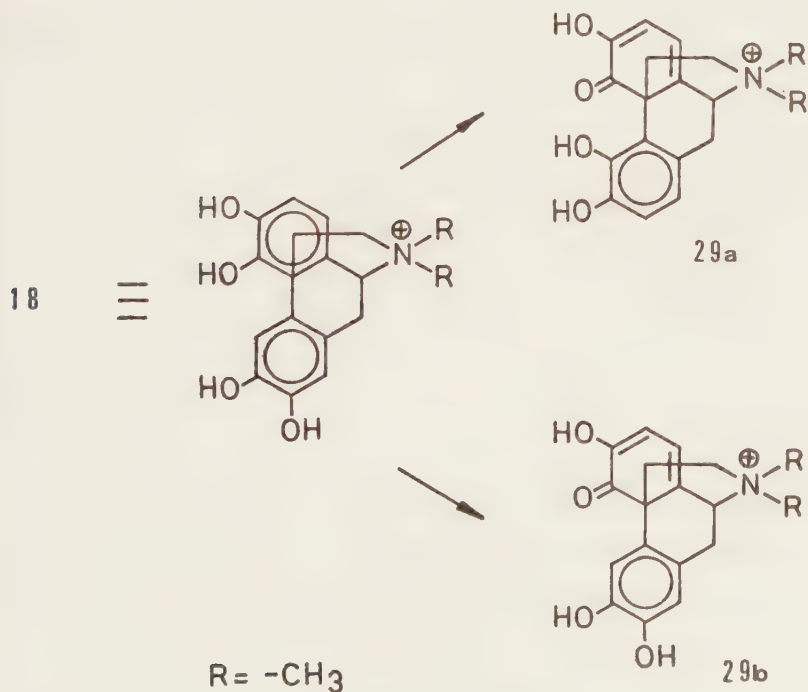
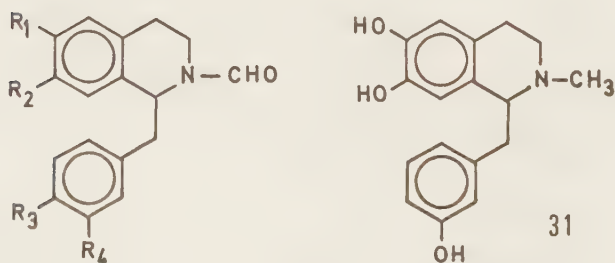


Abb. 10 Oxidation des Isolaudanosolin-methobromids in die Morphinan-Derivate **29a** und **29b**

In Fütterungsversuchen mit mehrfach markierten Vorstufen wurde von BLASCHKE<sup>42)</sup> der Reaktionsmechanismus der Biosynthese des Aporphinalkaloids Bulbocapnin aus Reticulin **12** untersucht. Das Ergebnis zeigte eine direkte Diphenylverknüpfung des Reticulins zum Aporphingerüst. Dienonzwischenstufen wurden nicht durchlaufen.

Untersuchungen an 1-Benzyl-tetrahydro-isochinolininen durch BAXTER und Mitarbeiter<sup>43)</sup> zeigten, daß die N-formylierten Verbindungen **30a**, **30b**, **30c** von Peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei pH 9,3 nicht oxidiert werden. Bei der Einwirkung des gleichen Enzyms auf Verbindung **31** konnte keine Bildung von Aporphinen nachgewiesen werden, wobei aus den Angaben der Autoren nicht zu entnehmen ist, ob **31** überhaupt von dem Enzym oxidiert wird (Abb. 11).



|            |                                                     |                                    |                   |
|------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------|
| <b>30a</b> | : R <sub>1</sub> =-OCH <sub>3</sub>                 | R <sub>2</sub> =R <sub>4</sub> =OH | R <sub>3</sub> =H |
| <b>30b</b> | : R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> =-OCH <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> =OH                 |                   |
| <b>30c</b> | : R <sub>1</sub> =R <sub>3</sub> =-OCH <sub>3</sub> | R <sub>2</sub> =R <sub>4</sub> =OH |                   |

Abb. 11

INUBUSHI und Mitarbeiter<sup>44)</sup> beobachteten bei der Oxidation quaternärer Aporphine (Ammoniumbromide und -jodide) vorwiegend

Kernhalogenierungen. Solche Reaktionen sind sehr wahrscheinlich, wenn auch das Halogenidion in dem wässrigen Reaktionsmilieu solvatisiert und damit stark geschützt vorliegt. Kernhalogenierung würde wahrscheinlich an der bevorzugten p-Position, am C<sub>8</sub> oder C<sub>6</sub>, -Atom erfolgen. Auch dann könnte man in einer Folgereaktion durch Halogen-Eliminierung eine C-C-Cyclisierung zum Aporphingerüst erwarten. Arbeiten von KAMETANI und NOGOUCHI<sup>45)</sup> berechtigen zu dieser Annahme.

## 4.2. Oxidation von (+)-O-Desmethyl-magnocurarin-bromid **19**

### 4.2.1. Chemische Oxidation mit Eisen-III-chlorid.

Da eine intramolekulare Reaktion infolge relativer Inaktivität des Benzylteils nicht möglich ist, kommt es aus sterischen Gründen zur Dimerisierung über eine Ätherbrücke. Von den vier theoretisch relevanten Möglichkeiten **32** - **35** zeigte sich als Hauptprodukt die C<sub>6</sub>-O-C<sub>5</sub>-Verknüpfung zu Verbindung **33** (vgl. Abb. 12).

Mögliche Verknüpfungen zwischen den Molekülen A und B:

| A                                   | B         |  |
|-------------------------------------|-----------|--|
| C <sub>6</sub> — O — C <sub>8</sub> | <b>32</b> |  |
| C <sub>6</sub> — O — C <sub>5</sub> | <b>33</b> |  |
| C <sub>5</sub> — O — C <sub>7</sub> | <b>34</b> |  |
| C <sub>8</sub> — O — C <sub>7</sub> | <b>35</b> |  |

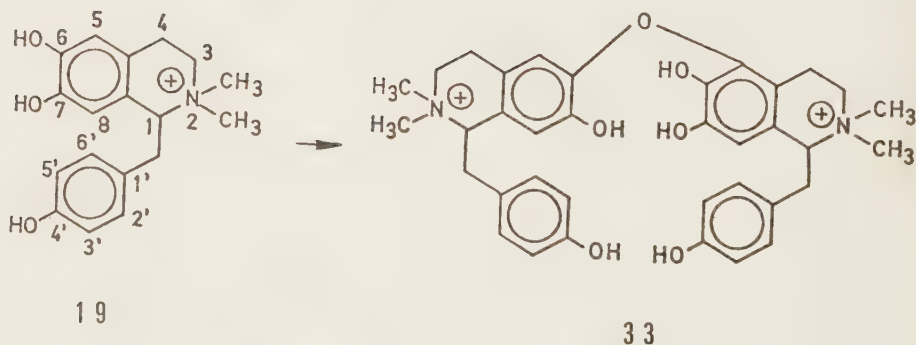


Abb. 12 Oxidation von O-Desmethyl-magnocurarin-bromid **19** mit Eisen-III-chlorid

#### 4.2.2. Phenoloxidase.

Die "Cresolase-Aktivität" der Phenoloxidase ermöglicht eine Hydroxylierung des monophenolischen Benzylteils des O-Desmethylnagocurarin-bromids. Die Geschwindigkeitskonstante  $k$  für Hydroxylierungsreaktionen ist jedoch klein. Es sollte daher - wenn überhaupt - nur ein geringer Teil der eingesetzten Verbindung 19 dieser Reaktion unterliegen. Entsprechend niedrig sollte die Konzentration des Hydroxylierungsproduktes Laudanosolin 8 sein. Eine Beschleunigung der monophenolischen Reaktion wäre durch Zugabe von Ascorbinsäure zu erwarten. Mit der Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit könnte die Laudanosolin-Bildung zur Hauptreaktion werden (Abb. 13).

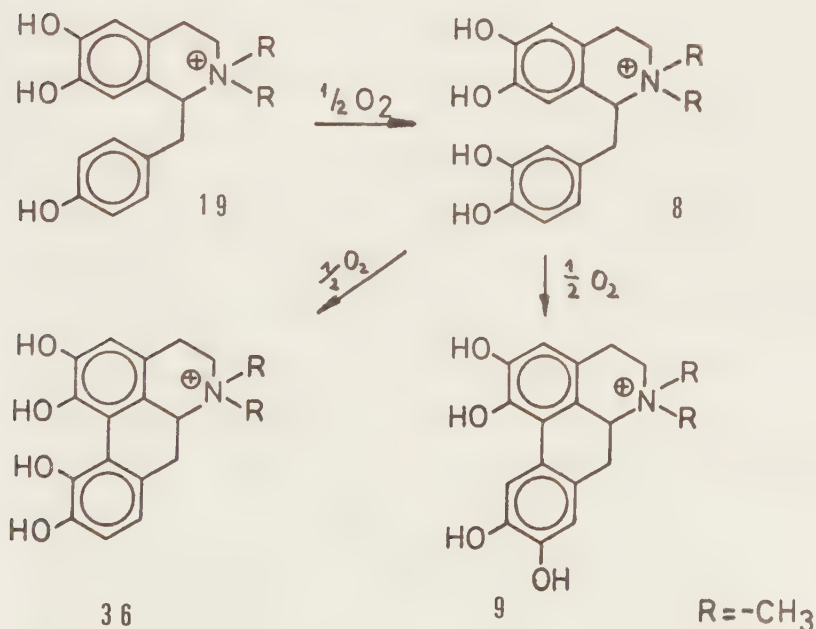


Abb. 13 Schema der Hydroxylierung und Oxidation von Isolaudanosolin-methobromid durch Phenoloxidase

Als Folgereaktionen wären darauf Verknüpfungen zwischen den Kohlenstoffatomen  $C_8-C_2$ , und/oder  $C_8-C_6$ , zu den Aporphinen **36** und **9** zu erwarten. Hierbei sollte infolge geringerer sterischer Hinderung und des weniger verdrillten Diphenylsystems Verbindung **9** als Hauptprodukt vorliegen (Abb. 13).

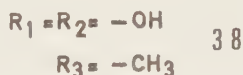
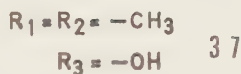
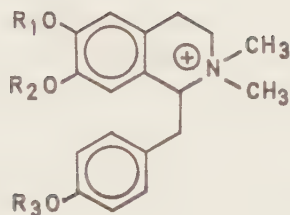
Die Unterscheidung der Oxidationsprodukte **36** und **9** ist mit Hilfe der UV-Spektroskopie möglich, wie aus den nachfolgenden Maxima zu ersehen ist.

Aporphin **36**  $\lambda_{\max}$  268-272 nm, Aporphin **9**  $\lambda_{\max}$  280-284 nm (S.41).

Als Hauptreaktion ist aber die rasche Oxidation der Brenzkatechingruppierung von **19** anzunehmen. Da eine intramolekulare Reaktion infolge relativer Inaktivität des Benzylteils nicht zu erwarten ist, könnte Dimerisierung erfolgen, die aus sterischen Gründen evtl. über eine Ätherbrücke verlaufen sollte, wie in Abb. 12 gezeigt wurde.

Parallel zur Dimerisierung oder im Anschluß an diese ist die Hydroxylierung des monophenolischen Benzylringes möglich. Eine weitere Reaktionsmöglichkeit besteht in einer antiparallelen Verknüpfung. Durch nucleophile Anlagerung des phenolischen Benzylhydroxyls an das o-Chinon entsteht dann eine dimere Verbindung vom Curin-Typ **7**. Diese Kondensationen würden vermutlich ebenfalls über einen Ionenmechanismus ablaufen.

Die Frage des bevorzugten Enzymangriffs ließe sich durch Verfolgung der Oxidationsgeschwindigkeit (z.B. manometrische Messung der Sauerstoffabsorption) von Armepavin **37** und Verbindung **38** im Vergleich zu O-Desmethyl-magnocurarin-bromid **19** erläutern. Eine Sauerstoffabsorption gleicher Intensität bei der enzymatischen Oxidation der Verbindungen **19** und **38** ließe auf einen ausschließlichen Angriff der o-Dihydroxygruppierung des O-Desmethyl-magnocurarin-bromids schließen. Diese Fragen konnten noch nicht geklärt werden.



#### 4.2.3. Laccase und Peroxidase/Wasserstoffperoxid.

In beiden Systemen könnten der Phenoloxidasereaktion analoge Produkte entstehen. Als Reaktionswege müßten hier jedoch Radikalmechanismen in Betracht gezogen werden.

1. Durch den Entzug eines Elektrons wird ein mesomeres Semichinon erhalten. Der Entzug eines weiteren Elektrons führt zu einem o-Chinon. Als eine Folgereaktion könnte Dimerisierung eintreten, wie bei der Phenoloxidase gezeigt wurde.

Theoretisch ist auch die intramolekulare Kupplung von Diradikalen möglich. Radikalbildungen an den Atomen C<sub>8</sub> und C<sub>1</sub>, würde zu einem 5-Ring-Spiran führen. Solche Spirane sind wenig stabil und lagern sich leicht zu Aporphinen um (s. Beispiele in Tab. 1).

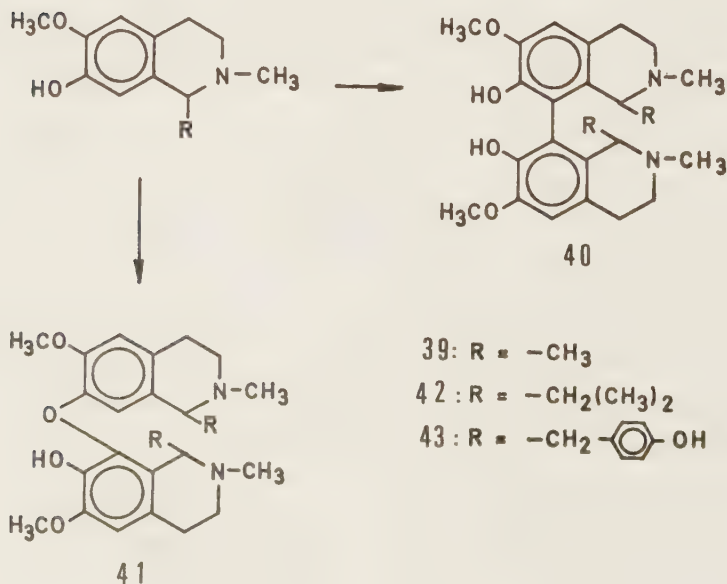
Die Diradikalbildung an C<sub>4a</sub> und C<sub>6</sub>, dagegen könnte zu einem Morphinanderivat führen (Abb. 1, Verbindung 3 ).

2. Nucleophile Anlagerung des Benzylhydroxyls an das o-Chinon: antiparallele Verknüpfung zum Curin-Typ 7 .
3. In dem System Peroxidase/O-Desmethyl-magnocurararin-bromid könnte nach Zugabe von Dihydroxyfumarsäure das Substrat zum Laudanosolin-methobromid hydroxyliert werden. An-

schließlich sollte Dehydrierung zu den Aporphinen 9 und/oder 36 erfolgen (Abb. 13). 9 sollte dabei bevorzugt entstehen.

INUBUSHI und Mitarbeiter<sup>44)</sup> konnten mit Peroxidase/Wasserstoffperoxid in wässriger Ammoniumacetatlösung (pH 7) das N-Methylisosalosolin 39 zu den Dimeren 40 und 41 oxidieren. Vergrößerung des Substituenten am C<sub>1</sub> zum Lophocerin 42 führte zur ausschließlichen Dimerisierung über eine Ätherbrücke, analog Verbindung 41. Wurde der Substituent am C<sub>1</sub> zum p-Hydroxybenzylrest erweitert, wie im N-Methyl-coclaurin 43, erhielten die Autoren<sup>44)</sup> neben einem dimeren Produkt analog der Verbindung 41 noch eine Anzahl weiterer Reaktionsprodukte (Abb. 14).

Diese Versuchsreihen zeigen, daß auch bei der Peroxidase-katalysierten Reaktion des O-Desmethyl-magnocurarin-bromids mit einem über eine Ätherbrücke verknüpften dimeren Reaktionsprodukt gerechnet werden kann.



# 5. Synthese von (+)-Isolaudanosolin-methobromid 18

## 5.1. $\beta$ -(2,3-Dimethoxyphenyl)-aethylamin 46

Ausgehend von 2,3-Dimethoxy-benzaldehyd 44 wurde durch Kondensation mit Nitromethan eine Kettenverlängerung zum 2,3-Dimethoxy- $\omega$ -nitrostyrol 45 vorgenommen<sup>46)</sup>. Um Polymerisation zu vermeiden, darf die Reaktionstemperatur von  $-5^{\circ}$  nicht überschritten werden. Nach Zugabe von verdünnter Schwefelsäure fiel das  $\omega$ -Nitrostyrol aus (Abb. 15). Seine Isolierung muß rasch erfolgen, da durch Anlagerung von Wasser an die Doppelbindung der Nitrolalkohol gebildet wird.

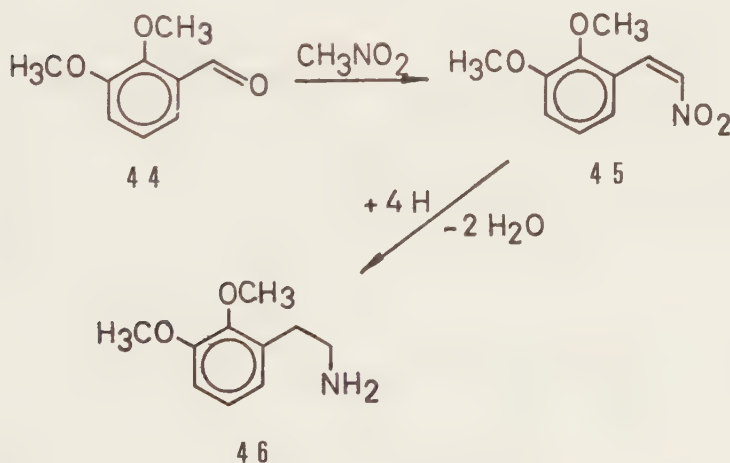


Abb. 15 Synthese des  $\beta$ -(2,3-Dimethoxyphenyl)-aethylamins 46

Die Reduktion zum  $\beta$ -(2,3-Dimethoxyphenyl)-aethylamin 46 wurde auf zwei Wegen durchgeführt.

- a. Mit Lithium-Aluminium-Hydrid in Tetrahydrofuran unter Stickstoffatmosphäre<sup>47)</sup>. Da die intermediär gebildeten Nitrostyrol-LiAlH<sub>4</sub>-Komplexe leicht entzündbar sind<sup>48)</sup>, wurde diese Methode trotz guter Ausbeute (88 %) durch ein von SLOTTA<sup>49)</sup> angegebenes Verfahren ersetzt.
- b. Danach wurde das ω-Nitrostyrol elektrolytisch an Bleielektroden reduziert.

5.2. Zur Darstellung der 3.4-Dimethoxyphenyl-essigsäure 49 wurde Iovanillin 47 mit Kaliumcyanid über das wasserlösliche Hydrosulfit in das Cyanhydrin 48 überführt, dieses mit Zinn-II-chlorid/H<sup>+</sup> reduziert und hydrolysiert und zu 49 methyliert (vgl. Abb. 16).

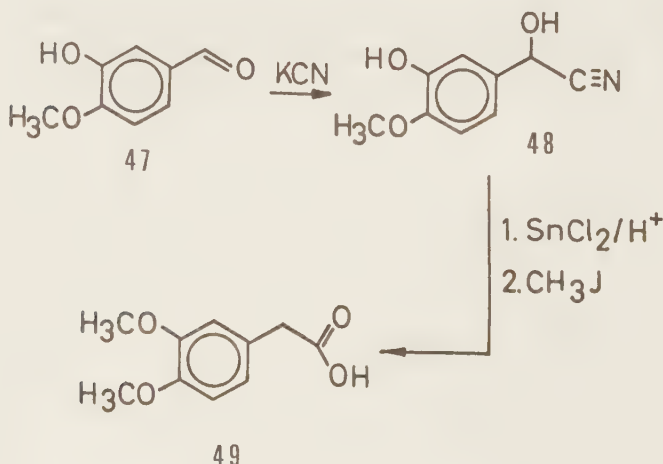


Abb. 16 Synthese von 3.4-Dimethoxyphenyl-essigsäure 49

5.3. Kondensation zum Säureamid 50 und Cyclisierung.  
Die von BLASCHKE<sup>37)</sup> beschriebene Kondensation von Säurechlorid und Amin erwies sich aus folgenden Gründen ungünstig: Das Phenyl-essigsäurechlorid wurde bei der Reinigung durch Destilla-

tion leicht polymerisiert. Bei der Reinigung über eine Aluminium-oxidsäule wurden nicht nur polymere, sondern auch Säurechlorid-anteile adsorbiert, die sich nur unter beträchtlichem Verlust eluieren ließen.

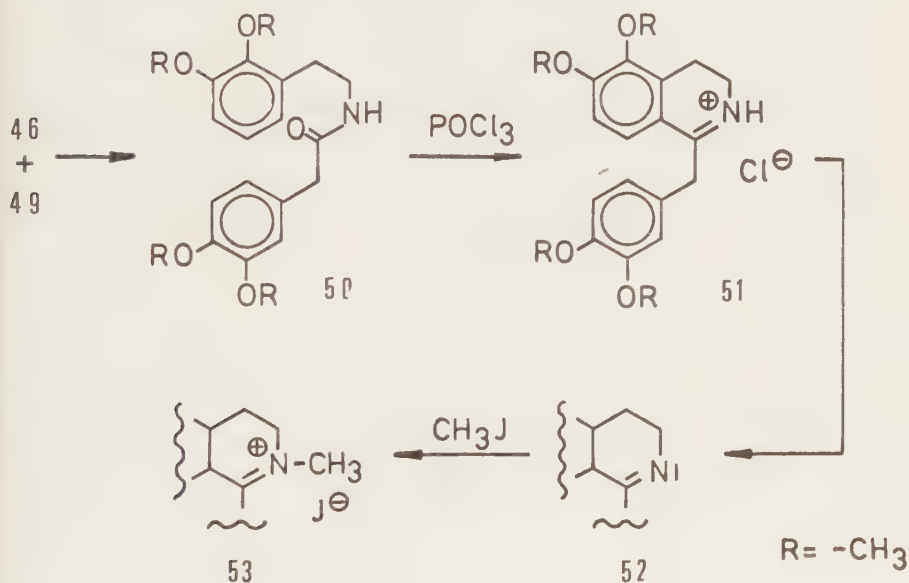


Abb. 17 Kondensation zum Säureamid 50 und Cyclisierung

Durch Kondensation von 46 und 49 am Wasserabscheider<sup>50)</sup> konnte das Säureamid fast quantitativ erhalten werden (93 %). Bei der anschließenden Cyclisierung nach BISCHLER-NAPIERALSKI wird die nucleophile Addition des Ringes an die Carbonylfunktion durch die elektronenliefernden Methoxygruppen erschwert. Das Dihydroisochinolin 51 liegt nach dem Ringschluss als stabiles Hydrochlorid vor. Da die Base 52 bereits durch Sauerstoffspuren zur  $\alpha$ -Ketoverbindung oxidiert wird, wurden die

folgenden Reaktionsschritte (Freisetzen der Base, Methylieren) unter Sauerstoffausschluß durchgeführt. In Anlehnung an FINKELSTEIN<sup>47)</sup> wurde Natriumalkoholat verwendet. Der Nachteil hierbei ist der große Verbrauch an Alkoholat, da das ölige Dihydro-isochinolin-hydrochlorid **51** noch geringe Mengen  $\text{POCl}_3$  sowie dessen Hydrolyseprodukte enthält.

Auf eine Reinigung von **52**, z.B. über das kristalline Hydroperchlorat, wurde wegen der Empfindlichkeit der Verbindung verzichtet. Methylierung des Imins **52** ergab **53** (Abb. 17).

5.4. Zum Hydrieren der Immoniumverbindung **53** wurde Natriumborhydrid verwendet. Das resultierende Tetrahydro-isochinolin **54** (Abb. 18) konnte, es ist in der Literatur als Öl beschrieben<sup>37)</sup>, farblos kristallin gewonnen werden. Quaternierung mit Methyljodid ergab (+)-Isolaudanosin-methojodid.

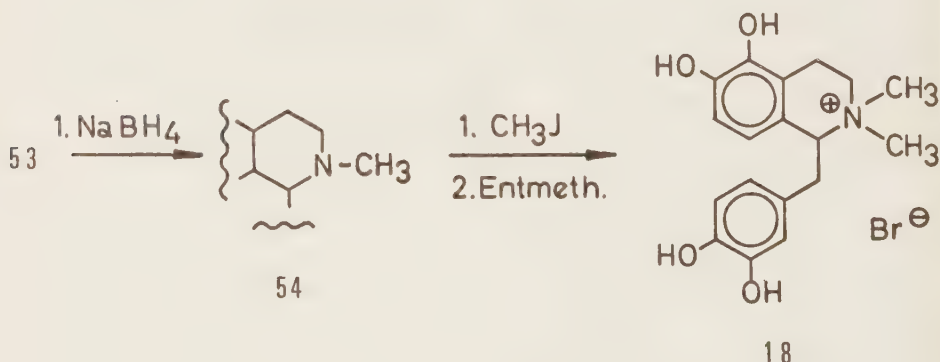


Abb. 18 Synthese von (+)-Isolaudanosolin-methobromid **18**

5.5. Zur Entmethylierung von Isolaudanosin-methojodid zum Isolaudanosolin-methobromid **18** wurden verschiedene Wege geprüft, da zunächst nur unvollständig entmethylierte Verbindung oder Zersetzungsprodukte erhalten werden konnten. Verbindungen

mit o-Dimethoxygruppen sind nur schwer zu entmethylieren, die Reaktion bleibt häufig auf der Stufe der Guajakolgruppierung stehen.

5.5.1. Die Ätherspaltung in dem System Aluminiumchlorid/Xylol, wie sie für das Laudanosin beschrieben wurde<sup>3)51)</sup>, führte zu polymeren, harzartigen Produkten.

5.5.2. Mit Jodwasserstoffsäure in Eisessig, unter Zusatz von Acetanhydrid zur Acetylierung der Hydroxylgruppen, erhielt ich neben der gewünschten Verbindung verschiedene nicht näher bestimmte Substanzen.

5.5.3. Mc OMIE und Mitarbeiter<sup>52)</sup> beschreiben Entmethylierungen durch Bortribromid. Die Reaktionstemperaturen liegen zwischen  $-60$  und  $-80^{\circ}$ ; die Methode schien daher für empfindliche Substanzen besonders geeignet. Der Verbrauch an Bortribromid beträgt ein Mol pro Äthergruppe und ein weiteres Mol für jede Gruppe mit einem reaktionsfähigen Stickstoff- oder Sauerstoffatom. Die nach der Ätherspaltung gebildeten Komplexe zwischen Bortribromid und den Methoxygruppen werden mit Wasser zersetzt.



Nach der Theorie von Mc OMIE könnte die Entmethylierung bei Brenzkatechin-dimethyläthern schrittweise über cyclische Borate

verlaufen, so daß für jede Brenzkatechingruppe ein Mol Reagens ausreichen würde (Abb. 19).

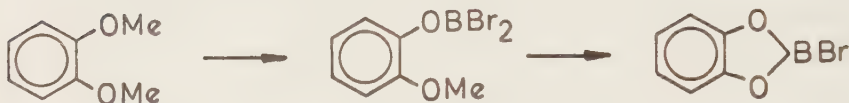


Abb. 19 Reaktion von Brenzkatechin mit Bortribromid

Da der Stickstoff im Isolaundosin-methojodid **18** quartär vorliegt und somit eine Reaktion des Bortribromids mit der Lewis-Base auszuschließen ist, sollten zwei Mol Reagens pro Mol Verbindung **18** ausreichen. Es erwies sich jedoch, daß eine vollständige Spaltung nur in Anwesenheit eines großen Überschusses an Bortribromid möglich war.

Zur Entmethylierung kleiner Substanzmengen (0,5-2,0 g) war diese Methode vorzüglich geeignet.

5.5.4. Ein größerer Ansatz wurde mit Bromwasserstoffsäure behandelt. Das Reaktionsgemisch bestand aus vier Komponenten (Dünnschichtchromatogramm), aus dem Isolaundosolin-methobromid nur in 24 %iger Ausbeute isoliert werden konnte.

6. Synthese von (+)-O-Desmethyl-magnocurarin-bromid 19

Ausgehend von 3,4-Dimethoxyphenyl-aethylamin (Homoveratrylamin) 57 und p-Methoxyphenyl-essigsäure 58 wurde die Synthese analog der des Isolaudanosolin-methobromids durchgeführt. Zur Entmethylierung zum O-Desmethyl-magnocurarin-bromid 19 wurde Bromwasserstoffsäure verwendet (Abb. 20).

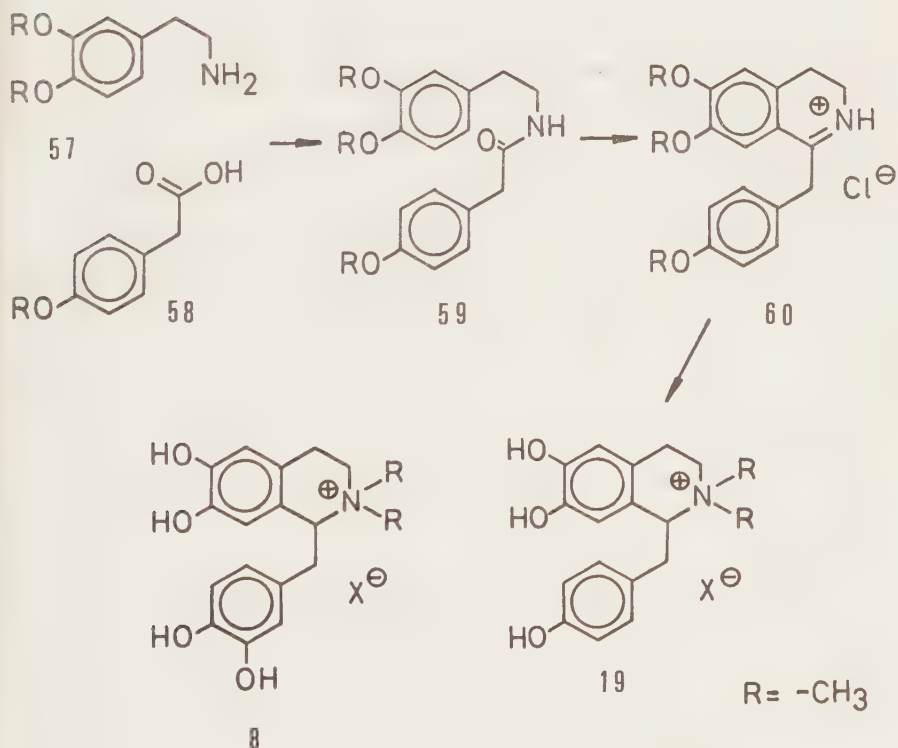


Abb. 20 Synthese von O-Desmethyl-magnocurarin-bromid 19

## 7. Enzymkatalysierte Oxidation von (+)-Isolaudanosolin-methobromid 18

Die Versuchsreihen wurden in wässrigem, z.T. gepuffertem Milieu durchgeführt. Da mit geringen Substratkonzentrationen gearbeitet werden mußte, boten sich zur Untersuchung der Reaktionsprodukte die manometrische, dünnschichtchromatographische und UV-spektroskopische Methode an.

### 7.1. Phenoloxidase.

#### 7.1.1. Manometrische Messungen.

Die beiden Brenzkatechingruppierungen bilden eine günstige Angriffssposition für das Enzym. Wird Isolaudanosolin-methobromid

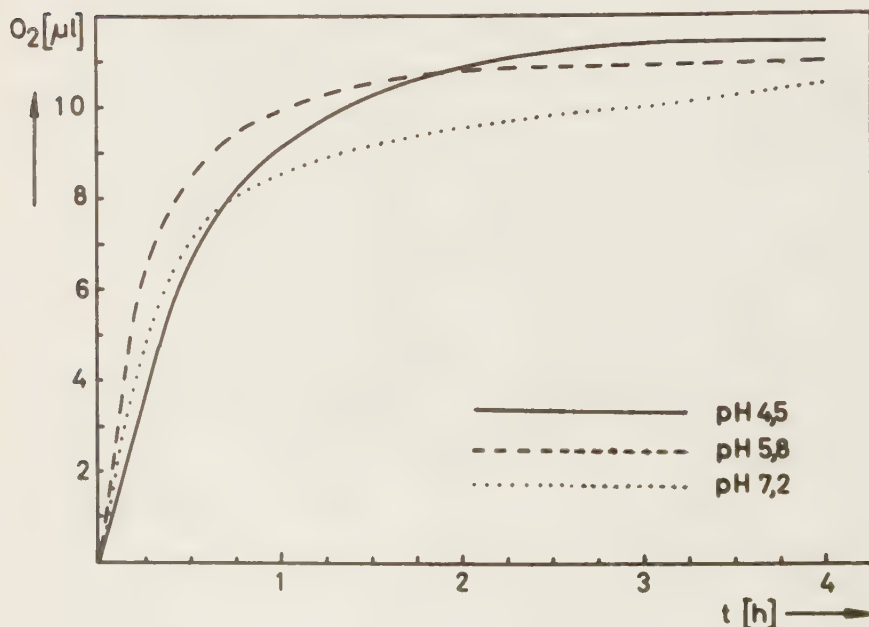


Abb. 21 Manometrie: Phenoloxidase/Isolaudanosolin-methobromid  
pH 4,5 5,8 und 7,2

zu den Aporphinen 26 und/oder 26a dehydriert, sollte die Sauerstoffabsorption spontan einsetzen, da die Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  der "Catecholase-Aktivität" groß ist.

Die Untersuchungen wurden bei pH 4,5 5,8 und 7,2 durchgeführt (Abb. 21).

pH 4,5: Die Sauerstoffabsorption setzte spontan ein und war nach 2 Stunden im wesentlichen beendet.

pH 5,8: Da dieser pH-Wert im Optimum der Phenoloxidase liegt, wurde anfangs eine leicht erhöhte Sauerstoffabsorption beobachtet. Die Reaktion ließ dementsprechend geringfügig früher an Intensität nach.

pH 7,2: Die Sauerstoffabsorption erstreckte sich über einen größeren Zeitraum, da das pH-Optimum der Phenoloxidase überschritten war. Die Intensität der Absorption war pro Zeiteinheit geringer.

Diese Ergebnisse entsprechen den Voraussetzungen für eine Oxidation zu den Aporphinen 26 und/oder 26a.

#### 7.1.2. Dünnschichtchromatographie.

Die Rf-Werte wurden der einfacheren Schreibweise und besseren Übersicht wegen als hRf ( $R_f \times 100$ ) angegeben und beziehen sich jeweils auf den oberen Rand der DC-Zonen.

Luftfeuchtigkeit, Korngröße des Sorbens, Temperatur, Entwicklungszeit und Schichtdicke der Platten stellen Faktoren dar, die wesentlich zur Beeinflussung der hRf-Werte beitragen. Die Ergebnisse von selbstgestrichenen Platten (Schichtdicke ca. 0,25 mm) auf Fertigplatten (Schichtdicke 0,1 mm) zu übertragen, gelang beispielsweise nicht. Die in den Versuchsreihen genannten Daten stammen daher ausschließlich von Fertigplatten. Ein weiterer Vorteil der Fertigplatten lag in der besseren Trennbarkeit der Reaktionsprodukte, was vermutlich auf die dichtere und gleichmäßigere Beschichtung zurückzuführen ist.

Trotz weitgehender Standardisierung der Arbeitsmethoden ließ sich die Fehlergrenze der hRf-Werte nur auf  $\pm 6$  mm reduzieren. Da eine Differenzierung der einzelnen Reaktionsprodukte infolge des nahen Zusammenliegens der Zonen meist nicht mehr möglich war, wurden die Ausgangs- und Vergleichssubstanzen in jedem Versuch mitchromatographiert. Die angegebenen Werte wurden aus mindestens 8-10 Versuchen gemittelt.

Eine Vergrößerung der Laufhöhe führte zu breiten und bei der Detektion blassen Zonen.

Mischchromatogramme wurden durch Auftragen einer Mischung der infrage kommenden Substratlösungen angefertigt.

Der Versuch, die Reaktionsprodukte mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie zu trennen, scheiterte vornehmlich aus zwei Gründen. Das im Handel erhältliche gipshaltige Cellulose-Pulver ist zur Herstellung dickerer Schichten (ca. 3-4 mm) ungeeignet, da beim Abbinden des Gipses häufig in der Cellulose-Schicht Risse entstehen. Die Verwendung unterschiedlicher Wassermengen zur Bereitung der Streichmasse bzw. die Variation der Homogenisierungszeiten, konnten die Ausbeute an brauchbaren Platten nicht erhöhen.

Der ausschlaggebende Nachteil lag jedoch in der wesentlich schlechteren Trennung der Reaktionsprodukte. Eine ungleichmäßige und wenig kompakte Beschichtung mag hierfür verantwortlich sein.

Mit Hilfe der Gelfiltration über Sephadex G 10 konnte lediglich das Enzym abgetrennt werden.

Nachfolgend sind die in Tab. 3 schematisch zusammengefaßten Chromatogramme, die bei pH 4,5 in verschiedenen Ansätzen erhalten wurden, beschrieben.

#### Nr. 1. Isolaudanosolin-methobromid 18 .

Der hRf-Wert der Ausgangsverbindung lag bei 62. Eine weitere, sehr schwache Zone war bei hRf 36 zu erkennen.

Da dieser Wert in sämtlichen Systemen auftrat, die noch Ausgangsverbindung enthielten, jedoch verschwand, sobald hRf 62 nicht mehr vorhanden war, nehme ich an, es handelte sich um eine durch das Fließmittel bedingte Salz- bildung. Für diese Vermutung spricht ferner, daß in ei- nem Fließmittel, das keine Salz- bildung zuließ, (Chloro- form/Methanol) eine Auftrennung nicht erfolgte. hRf 36 wurde nicht in die Tabellen aufgenommen.

| Nr<br>Zt | 1  | 2  | 3  | 4    | 5  |      |     |      |
|----------|----|----|----|------|----|------|-----|------|
|          |    |    | 5' | 200h | 5' | 1h   | 24h | 200h |
| hRf      | 62 | 62 |    |      | 62 | 62   | 62  | (62) |
|          |    |    |    | 51   |    |      |     |      |
|          |    |    |    | 45   |    | (45) | 45  | 45   |
|          |    | 32 |    |      | 32 | 32   | 32  |      |
|          |    |    |    |      | 26 | 26   | 26  |      |
|          |    | 21 | 21 | 21   | 21 | 21   | 21  | 21   |
|          |    | 14 | 14 | 14   | 14 | ↑    | ↑   | ↑    |
|          |    |    |    | 5    |    | ↓    | ↓   | ↓    |
|          |    |    |    |      |    |      | 0   | 0    |

Nr. 1 Isolaudanosolin-methobromid

Nr. 2 Autoxidation von Isolaudanosolin-methobromid

Nr. 3 Aporphin 26 , erhalten durch Oxidation von Isolaudanosolin-methobromid mit  $Fe^{3+}$

Nr. 4 Autoxidation von Aporphin 26

Nr. 5 Phenoloxidase/Isolaudanosolin-methobromid

Doppelpfeil: Schwanzbildung

O: am Start verbleibende Substanz

Tab. 3 Dünnschichtchromatographie bei pH 4,5  
Phenoloxidase/Isolaudanosolin-methobromid 18

Nr. 2. Autoxidation von Isolaudanosolin-methobromid.

Es zeigten sich nach 72 Stunden im UV-Licht drei schwa- che Zonen, die nach 200 Stunden mit DRAGENDORFF's Rea- gens sichtbar gemacht werden konnten. Die hRf-Werte la- gen bei 14, 21 und 32; daneben zeigte sich Ausgangssub- stanz.

Nr. 3. Aporphin 26 (Dehydro-isolaudanosolin-methobromid), erhalten durch Oxidation von Isolaudanosolin-methobromid mit 1m  $\text{FeCl}_3$ -Lösung.

hRf-Werte: 14 und 21. Der Literatur<sup>4)</sup> zufolge, handelt es sich hier um eine Racemattrennung des Aporphins 26 .

Nr. 4. Autoxidation von Aporphin 26 .

Das Chromatogramm der Lösung wies nach 200 Stunden weitere Zonen bei hRf 45 und 51 auf. Die Strukturen dieser Autoxidationsprodukte sind unbekannt.

Nr. 5. Phenoloxidase/Isolaudanosolin-methobromid.

Nach 5 Min. waren DRAGENDORFF- und UV-positive Zonen mit den hRf-Werten 14, 21, 26, 32 und 62 zu verzeichnen. Zone 14 war nur isoliert zu erkennen, wenn die Entwicklung des Chromatogrammes in analysenreinen Fließmitteln und ohne Sauerstoffzutritt erfolgte. Unter normalen Bedingungen zeigte sich bereits nach 5 Min. Schwanzbildung.

Am Start verbliebene Substanzen lassen Polymere vermuten. Nach einer Stunde war Zone hRf 14 auch unter luftfreien Bedingungen nicht mehr zu differenzieren. Hinzugekommen war eine Substanz mit dem hRf-Wert 45, zunächst nur undeutlich sichtbar. Im Verlauf von 24 Stunden gewann hRf 45 an Intensität. Gleichzeitig vergrößerte sich die Anhäufung am Start verbleibender Substanzen.

Während einer Woche wurde wiederholt Enzymlösung zum Reaktionsansatz gefügt. Das Chromatogramm zeigte jetzt nur noch eine schwache Anwesenheit von Isolaudanosolin-methobromid, dagegen gewann hRf 45 weiterhin an Intensität. Neue Zonen kamen nicht hinzu, es kann daher angenommen werden, daß es sich bei dieser Substanz um ein stabiles Produkt mit Amin- und Phenolcharakter handelt.

pH 5,8 und pH 7,2.

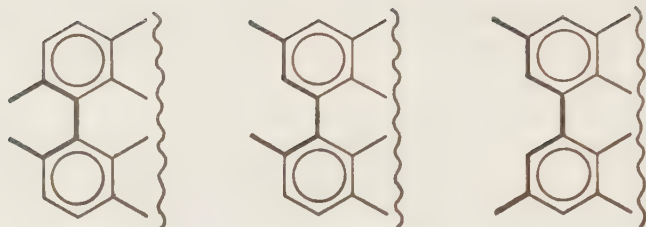
Die Oxidation in den gepufferten Systemen lieferte in den gleichen Zeitabschnitten gleiche Chromatogramme, wie sie bei pH 4,5 erhalten wurden. Die unterschiedliche Oxidationsgeschwindigkeit,

die im Vergleich zur manometrischen Messung beobachtet wurde, konnte in den Chromatogrammen nicht reproduziert werden, da der Ausschluß von Luftsauerstoff hier nicht absolut möglich war.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß in den drei pH-Bereichen analoge Ergebnisse erzielt wurden. Die Oxidation von Isolaudanosolin-methobromid **18** mit  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen führte zu dem Aporphin **26**, das sich im Verteilungschromatogramm in die optischen Antipoden mit den  $\text{hRf}$ -Werten 14 und 21 trennte. Die Phenoloxidase-katalysierte Dehydrierung von **18** führte zu einem Reaktionsgemisch, das neben dem Produkt  $\text{hRf}$  45 noch Verbindungen mit den Werten  $\text{hRf}$  14 und 21 aufwies. Eine Mischung der Reaktionslösungen Nr. 3 und Nr. 4 brachte keine weitere chromatographische Trennung. Die Zonen  $\text{hRf}$  14 und 21 blieben deckungsgleich. Diese Ergebnisse lassen eine Apophinbildung möglich erscheinen.

#### 7.1.3. UV-Spektroskopie.

Aporphine lassen sich durch die Lage ihrer Absorptionsmaxima unterscheiden<sup>4)53)</sup>. Je stärker verdrillt bzw. je energischer das Diphenylsystem eines Aporphins ist, desto größer ist die sich für das Absorptionsmaximum ergebende Blauverschiebung. So liegt  $\lambda_{\text{max}}$  für das Aporphin **26** mit planarem Diphenylsystem oberhalb 284 nm, für die Aporphine **9** und **26a** zwischen 280 und 284 nm und für das stark verdrillte System **36** zwischen 268 und 272 nm (Abb. 22).



$\lambda_{\max}$  268-272 nm  
36

$\lambda_{\max}$  280-284 nm  
9 und 26a

$\lambda_{\max}$  284  
26

Abb. 22 Unterscheidung der Aporphine durch ihre Absorptionsmaxima

Die Absorptionsmaxima der folgenden Untersuchungen sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

pH 4,5:

Nr. 1. Isolaudanosolin-methobromid.

Absorption  $\lambda_{\max}$  285 nm. Das Spektrum ist in Abb. 23 dargestellt.

Nr. 2. Autoxidation von Isolaudanosolin-methobromid.

Innerhalb von 200 Stunden zeigten sich Maxima bei 259, 285 und 360 nm. Die Werte der Autoxidation wurden zu Vergleichszwecken aufgenommen, da die Bildung von Dehydroisolaudanosolin-methobromid 26 anzunehmen war.

Nr. 3. Aporphin 26 (Dehydroisolaudanosolin-methobromid), erhalten durch Oxidation von Isolaudanosolin-methobromid mit 1m Eisen-III-chloridlösung.

$\lambda_{\max}$  259, 289 und eine Schulter bei 320 nm. Diese Daten entsprechen Literaturangaben<sup>37)</sup>.

Nr. 4. Autoxidation von Aporphin 26.

Die wässrige Lösung von 26 war instabil. Nach 200 Stunden wurden zusätzliche Maxima bei 223 und 365 nm gemessen.

| Nr. | Zeit | $\lambda$ max in nm |     |     |       |       |         |       |         |
|-----|------|---------------------|-----|-----|-------|-------|---------|-------|---------|
| 1   |      | -                   | -   | -   | 285   | -     | -       | -     | -       |
| 2   | 200h | -                   | -   | 259 | 285   | -     | -       | 360   | -       |
| 3.  |      | -                   | -   | 259 | -     | 289   | (320)   | -     | -       |
| 4.  | 200h | 223                 | -   | 259 | -     | 289   | (320)   | 365   | -       |
| 5.  | 5'   | -                   | -   | 259 | -     | 287-9 | (320-2) | -     | -       |
| 6.  | 3'   |                     | -   | -   | 285-7 | -     | (320)   | -     | -       |
|     | 30'  | 220                 | -   | 262 | -     | 289   | (320)   | 365   | -       |
|     | 3 h  | 220 (240)           | 262 | -   | 289   | (320) | 365     | -     | -       |
| 7.  | 5'   | -                   | -   | 260 | -     | 289   | (320)   | 360-5 | -       |
| 8.  | 30'  | -                   | -   | 262 | -     | 290   | (320-5) | -     | -       |
|     | 1 h  | 225                 | -   | 262 | -     | 290   | (320-5) | 365   | -       |
| 9.  | BV   | -                   | -   | -   | 282   | -     | -       | -     | -       |
|     | 30"  | 215                 | -   | -   | 283-5 | -     | (330)   | -     | 380-420 |
|     | 5'   | 215                 | -   | 260 | 283-5 | -     | (330)   | -     | -       |

Nr.1 Isolaudanosolin-methobromid

Nr.2 Autoxidation von Isolaudanosolin-methobromid

Nr.3. Aporphin 26 , erhalten durch Oxidation von  
Isolaudanosolin-methobromid mit  $Fe^{3+}$

Nr.4. Autoxidation von Aporphin 26

Nr.5. DC-Eluat von Aporphin 26 , hRf 14 und 21

Nr.6. Phenoloxidase/Isolaudanosolin-methobromid

Nr.7. DC-Eluat von Phenoloxidase/Isolaudanosolin-  
methobromid, hRf 14 und 21

Nr.8. Laccase/Isolaudanosolin-methobromid

Nr.9. Peroxidase/Wasserstoffperoxid/Isolaudanosolin-  
methobromid

BV: Blindversuch

Tab. 4 UV-Spektroskopie: Enzym/Isolaudanosolin-methobromid 18

Nr. 5. Dünnschichtchromatographie (DC).

Das Eluat der Zonen hRf 14 und 21 des definierten Aporphins 26, das durch Oxidation von Isolaudanosolin-methobromid mit  $\text{FeCl}_3$  erhalten wurde, zeigte folgendes Spektrum:  $\lambda_{\text{max}}$  259, 287-9 und 320-2 (sh) nm. Die UV-Daten dieser beiden Zonen stimmen also mit dem UV-Spektrum einer Lösung des nicht chromatographisch aufgetrennten Aporphins 26 überein.

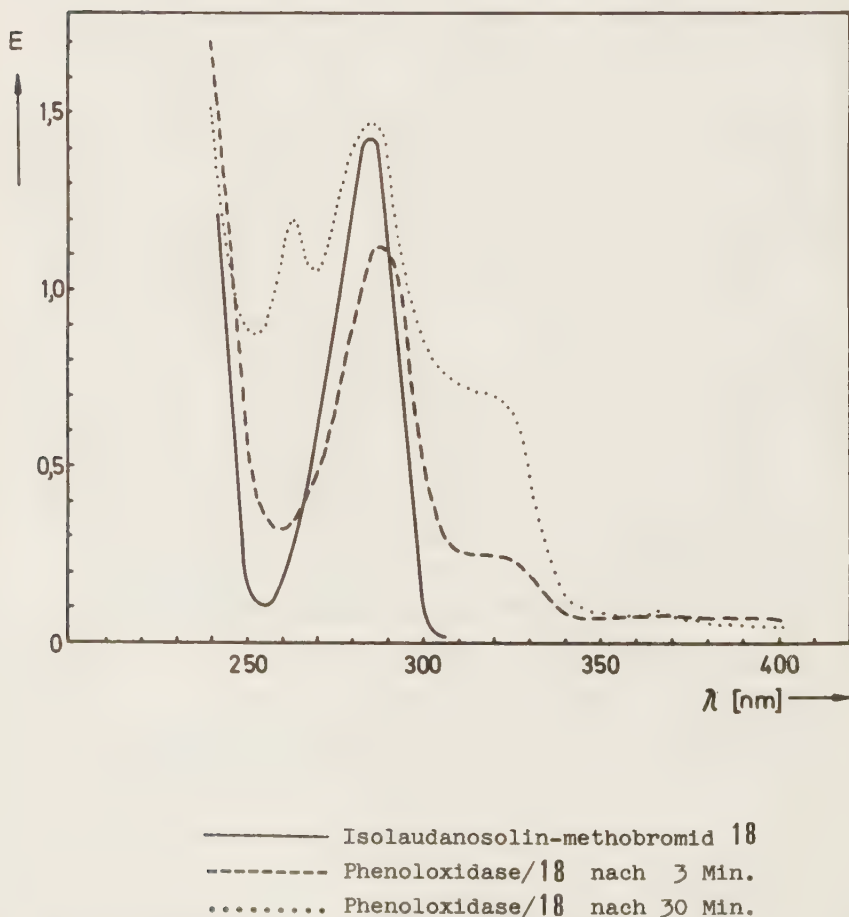


Abb. 23 UV-Spektroskopie bei pH 4,5 Phenoloxidase/  
Isolaudanosolin-methobromid 18

Nr. 6. Phenoloxidase/Isolaudanosolin-methobromid (Abb. 23).

Nach dreiminütiger Oxidation lagen Maxima bei 285-287 und 320 (sh) nm vor. Nach insgesamt 30 Min. wurden zusätzliche Maxima bei 220, 262 und 365 nm gefunden; die zuvor genannten hatten an Intensität gewonnen. Nach 3 Stunden war eine Schulter bei 240 nm zu beobachten, sämtliche Maxima hatten zu diesem Zeitpunkt an Intensität stark verloren.

Nr. 7. Dünnschichtchromatographie: Eluat von Phenoloxidase/Isolaudanosolin-methobromid.

Eluiert wurden die Zonen hRf 14 und 21 eines Chromatogrammes, das nach fünfminütiger Oxidationsdauer angefertigt wurde. Das Spektrum des Eluats zeigte folgende Absorptionen:  $\lambda_{\max}$  260, 289, 320 (sh) und 360-365 nm. Abgesehen von  $\lambda_{\max}$  360-365 nm stimmten die Maxima mit denen des definierten Aporphins 26 überein.

Die Auswertung der gepufferten Systeme (pH 5,8 und 7,2) ergab analoge Daten in geringer zeitlicher Verschiebung.

Insgesamt konkretisieren die UV-spektroskopischen Ergebnisse die Vermutung der Aporphinbildung bei der Phenoloxidase-katalysierten Oxidation von Isolaudanosolin-methobromid.

## 7.2. Laccase

In den drei pH-Bereichen waren nach 30 Minuten im UV-Licht zwei schwach erkennbare Zonen mit den hRf-Werten 14 und 21 sichtbar. Nach einer Stunde war die Detektion mit DRAGENDORFF-THIESS-Reagens positiv. Im Verlauf von 24 Stunden wurde der untere Teil des Chromatogrammes infolge Schwanzbildung undifferenzierbar, die Konzentration der Ausgangsverbindung ging deutlich zurück. Neue Substanzen wurden nicht beobachtet. Sämtliche Chromatogramme zeigten am Start verbleibende Substanzen (Tab. 5 Nr. 6).

Die UV-Spektren wurden in 0.1 n Salzsäure aufgenommen. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten konnten folgende Absorptionen gemessen werden:  $\lambda_{\max}$  262, 290 und 320-325 nm (sh); nach einer Stunde zusätzliche Banden bei 225 und 365 nm.  $\lambda_{\max}$  262 nm hatte zu diesem Zeitpunkt an Intensität gewonnen (Tab. 4 Nr. 8).

Die dünnschichtchromatographischen und UV-spektroskopischen Ergebnisse weisen auf die Bildung des Aporphins 26 hin.

## 7.3. Peroxidase/Wasserstoffperoxid.

### 7.3.1. Dünnschichtchromatographie (Tab. 5 Nr. 7).

Die Reaktion setzte außerordentlich rasch ein. Nach 30 Sekunden war die Substratlösung braun gefärbt und das Chromatogramm zeigte deutliche Zonen mit den hRf-Werten 14, 21, 26, 32, 62 sowie am Start verbleibende Substanzen. Eine schwache Schwanzbildung war bereits zu erkennen. Nach einer Stunde war eine Verbindung mit dem hRf-Wert 51 nachzuweisen, die auch bei der Autoxidation beobachtet worden war. Der untere DC-Bereich ließ sich nicht mehr differenzieren. Ausgangssubstanz war nicht mehr vorhanden.

Die Ergebnisse in den drei pH-Bereichen waren identisch.

| Nr. | 1  | 2  | 3  | 4        | 6   | 7    |     |              |    |     |
|-----|----|----|----|----------|-----|------|-----|--------------|----|-----|
| Zt  |    |    | 5' | 200h     | 15' | 24h  | 30" | 5'           | 1h | 24h |
| hRf | 62 | 62 |    | 51<br>45 | 62  | (62) | 62  | (62)<br>(51) | 51 | 51  |
|     |    | 32 |    |          |     |      | 32  | 32           | 32 |     |
|     |    |    |    |          |     |      | 26  | 26           |    |     |
|     |    | 21 | 21 | 21       | 21  |      | 21  | 21           |    |     |
|     |    | 14 | 14 | 14       | 14  |      | 14  |              |    |     |
|     |    |    |    | 5        |     |      | -   |              |    | 5   |
|     |    |    |    |          | 0   | 0    | 0   | 0            | 0  | 0   |

Nr.1. Isolaudanosolin-methobromid

Nr.2. Autoxidation von Isolaudanosolin-methobromid

Nr.3. Aporphin **26**, erhalten durch Oxidation von Isolaudanosolin-methobromid mit  $\text{Fe}^{3+}$

Nr.4. Autoxidation von Aporphin **26**

Nr.6. Laccase/Isolaudanosolin-methobromid

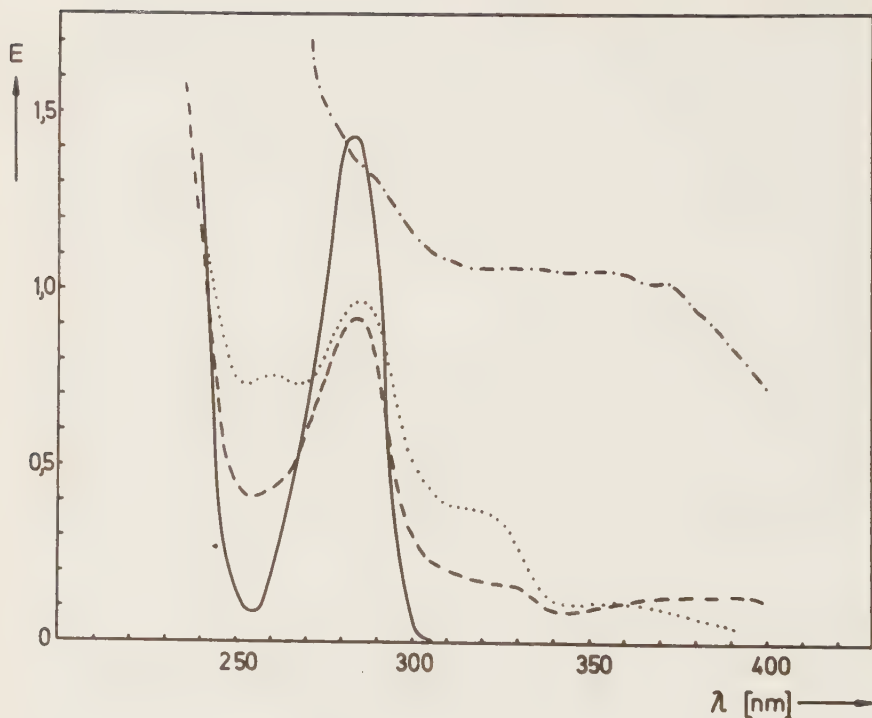
Nr.7. Peroxidase/ $\text{H}_2\text{O}_2$ /Isolaudanosolin-methobromid

Tab. 5 Dünnschichtchromatographie bei pH 4,5  
Enzym/Isolaudanosolin-methobromid **18**

### 7.3.2. UV-Spektroskopie (Tab. 4 Nr. 9).

pH 4,5 (vgl. Abb. 24).

Nach 30 Sekunden zeigte die Substratlösung Maxima bei 215, 283-285, 330 (sh) und eine auffallend breite und schwache Bande bei 380-420 nm. Letztere könnte als verbotener  $n-\pi^*$ -Übergang der intermediär auftretenden o-Chinone interpretiert werden, insbesondere da sie in späteren Aufnahmen fehlte.



- Isolaudanosolin-methobromid  
----- Peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Isolaudanosolin-methobromid n.30 Sek.  
..... Peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Isolaudanosolin-methobromid n. 5 Min.  
-.-.-.- Peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Isolaudanosolin-methobromid n.30 Min.

Abb. 24 UV-Spektroskopie bei pH 4,5  
Peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Isolaudanosolin-methobromid 18

Nach 5 Minuten wurde ein weiteres Maximum geringer Intensität bei 260 und eine Verstärkung der Schulter bei 330 nm wahrgenommen.

pH 5,8 und 7,2

Die Reaktion erfolgte wesentlich schneller, führte jedoch zu den gleichen Ergebnissen.

UV-Spektren und DC-Ergebnisse stimmen zeitlich nicht überein. Die Bildung der im Chromatogramm nach 30 Sekunden beobachteten Zone, insbesondere hRf 14 und 21, deren Maxima im Spektrum erst nach 5 Minuten faßbar waren, ist wahrscheinlich wiederum auf die Einwirkung von Luftsauerstoff während der Chromatogramm-Bearbeitung zurückzuführen.

Das bei der Oxidation mit Eisen-III-chlorid, Phenoloxidase und Laccase bei 289 - 290 nm erscheinende Hauptmaximum wird bei der Peroxidaseoxidation um 4 nm nach 285 nm verschoben. Diese hypsochrome Verschiebung läßt zwei Deutungen zu:

1. In einem Blindversuch wurde Peroxidase/Wasserstoffperoxid durch Eintragen in n HCl/Methanol sofort inhibiert. Nach Zugabe von Isolaudanosolin-methobromid zeigte die Lösung eine Blauverschiebung des Maximums von 285 nach 282 nm. Die Wasserstoffperoxidkonzentration übersteigt in den gewählten Versuchsbedingungen die äquimolare Menge an Substrat, so daß eine Reaktion zwischen den beiden Partnern möglich wäre.
2.  $\lambda_{\max}$  282 nm liegt im charakteristischen Bereich der Aporphine mit stärker verdrilltem Diphenylsystem (S. 41). Das würde auf die Bildung des Aporphins 26a hinweisen. Die chromatographischen Ergebnisse widersprechen dieser Aussage nicht. Vermutlich unterscheiden sich die beiden Aporphintypen 26 und 26a chromatographisch nicht stark, so daß bei einer Fehlergrenze von  $\text{hRf} \pm 6 \text{ mm}$  eine gültige Aussage bestenfalls durch ein Mischchromatogramm erzielt werden könnte.

Zusammenfassend kann folgendes gesagt werden: Phenoloxidase, Laccase und Peroxidase/ $H_2O_2$  katalysieren die Oxidation von Isolaudanosolin-methobromid. In den Phenoloxidase- und Laccase-katalysierten Ansätzen entsteht neben anderen ein Reaktionsprodukt mit den  $R_f$ -Werten 14 und 21 und den Absorptionsmaxima 262, 289, 320 (sh) nm. Diese Daten decken sich mit denen des definierten Aporphins 26 (Dehydroisolaudanosolin-methobromid), so daß mit großer Wahrscheinlichkeit eine Dehydrierung des Isolaudanosolin-methobromids zu 26 eingetreten ist.

Im Peroxidase-katalysierten Ansatz sprechen die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen ebenfalls für eine Dehydrierung zu dem Aporphin 26. Die UV-spektroskopischen Untersuchungen bestätigen die dünnschichtchromatographischen, lassen andererseits aber auch die Bildung des Aporphins 26a mit stärker verdrilltem Diphenylsystem möglich erscheinen.

## 8. O-Desmethyl-magnocurarin-bromid<sup>19</sup>

### 8.1. Phenoloxidase.

#### 8.1.1. Manometrische Messungen.

Sofern die enzymatische Oxidation allein mit der Hydroxylierung des Benzylringes beginnen sollte, ist eine Induktionszeit erforderlich. Während dieser steigt die Sauerstoffabsorptionskurve nur schwach an, da die Geschwindigkeitskonstante  $k_1$  der "Cresolase-Aktivität" klein ist. Die Induktionszeit kann durch die Hydroxylierung beschleunigende Substanzen (p-Cumarsäure, Kaffeesäure) verkürzt oder aufgehoben werden. Die darauffolgende Oxidation des Hydroxylierungsproduktes Laudanosolin-methärbromid <sup>8</sup> müßte sich dann durch starke Erhöhung der Sauerstoffabsorption anzeigen.

Spontaner Sauerstoffverbrauch zu Beginn der Reaktion könnte bedeuten, daß Hydroxylierung und Oxidation parallel verlaufen. Ein solcher Verlauf ist jedoch wegen der vorliegenden Brenzkatechinstruktur nicht unbedingt zu erwarten. Vielmehr sollte mit bevorzugtem Angriff auf die o-Dihydroxygruppierung gerechnet werden.

Wie aus Abb. 25 zu ersehen ist, setzte die Sauerstoffabsorption sofort, jedoch mit mäßiger Geschwindigkeit ein. Während der Beobachtungsdauer (8 Stunden) wurden in gleichen Zeiteinheiten nahezu gleiche Mengen Sauerstoff verbraucht, so daß sich die Absorptionsfunktion einer Geraden näherte. Eine eindeutige Induktionsperiode, wie sie bei alleiniger Hydroxylierung von O-Desmethyl-magnocurarin-bromid zu erwarten wäre, war nicht vorhanden. Andererseits sollte bei einem vorwiegenden Angriff auf die o-Dihydroxygruppierung des Isochinolinteils die Sauerstoffabsorption zu Beginn der Reaktion höher sein als die in Abb. 25 dargestellte, da die Geschwindigkeitskonstante der "Catecholase-Aktivität" der Phenoloxidase relativ groß ist. Der Verlauf der Absorptionskurve läßt die Interpretation verschiedener, parallel verlaufender Reaktionen zu. Dabei ist ein gleichzeitiger Angriff an der o-Dihydroxygruppierung und der monophenolischen Gruppe in Betracht zu ziehen.

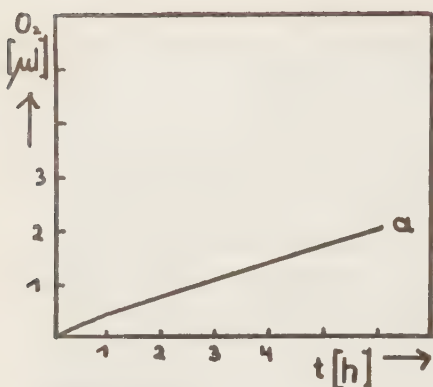


Abb. 25

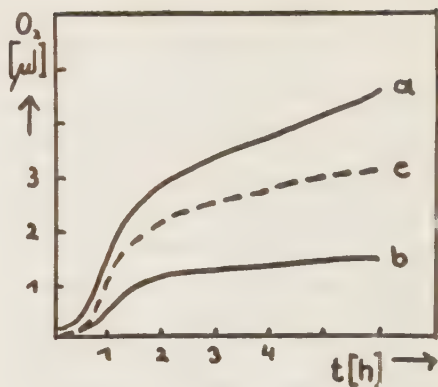


Abb. 26

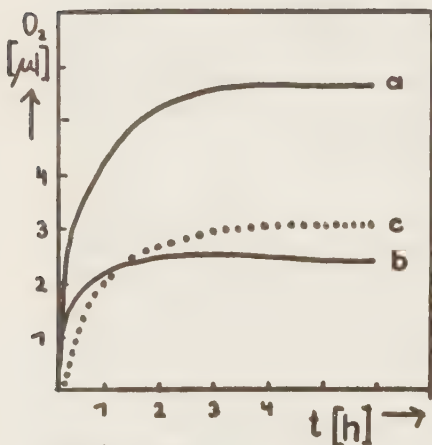


Abb. 27

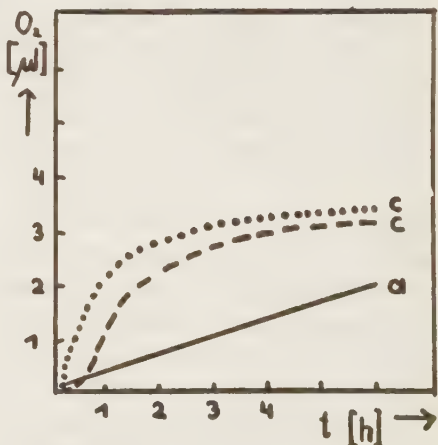


Abb. 28

# Manometrie bei pH 4,5

## Phenoloxidase/O-Desmethyl-magnocurarin-bromid 19

Abb. 25 a. Phenoloxidase/19

Abb. 26 a. Phenoloxidase/p-Cumarsäure/ 19

b. Phenoloxidase/p-Cumarsäure

c. Resultierende aus a-b

Abb. 27 a. Phenoloxidase/Kaffeesäure/19

b. Phenoloxidase/Kaffeesäure

c. Resultierende aus a-b

Abb. 28 c. Die Resultierenden (mit Überträgern) im Vergleich zu

a. Abb. 25 (ohne Überträger)

### Überträger: p-Cumarsäure

Es schien interessant zu untersuchen, welchen Einfluß der Zusatz von phenolischen Verbindungen als Überträgersubstanz hat. Hierdurch kann es häufig zu einer Erhöhung der Oxidierbarkeit bzw. der Oxidationsgeschwindigkeit der durch die Phenoloxidase initiierten Reaktion kommen.

Hierzu wurde zunächst die p-Cumarsäure (4-Hydroxy-zimtsäure) als Überträger herangezogen. Sie wird durch Phenoloxidase in erster Reaktionsstufe vor allem zu der 3.4.-Dihydroxy-zimtsäure (Kaffeensäure) hydroxyliert. Diese wird dann weiter enzymatisch zum entsprechenden o-Chinon oxidiert.

Zusatz von p-Cumarsäure brachte eine deutliche Erhöhung der Sauerstoffabsorption. Aus dem Vergleich der Gemische Phenoloxidase/p-Cumarsäure/O-Desmethyl-magnocurarin-bromid (Abb. 26, Kurve a) und Phenoloxidase/p-Cumarsäure (Abb. 26, Kurve b) ging hervor, daß der Mehrverbrauch an Sauerstoff auf das Vorhandensein von O-Desmethyl-magnocurarin-bromid zurückzuführen war. Ferner war eine Induktionszeit zu beobachten, die für einen primären Hydroxylierungsvorgang sprach. Die Induktionszeit in dem System Phenoloxidase/p-Cumarsäure (Abb. 26, Kurve b) ist auf die Hydroxylierung der p-Cumarsäure zur Kaffeensäure zurückzuführen. Die Subtraktion der Kurve b von Kurve a ergibt die Resultierende Kurve c ( $a-b=c$ ), die den Sauerstoffverbrauch anzeigt, der durch die Anwesenheit von O-Desmethyl-magnocurarin-bromid bedingt wurde. Parallel zur Hydroxylierung der p-Cumarsäure findet ein Angriff auf die Brenzkatechingruppierung des O-Desmethyl-magnocurarin-bromids statt.

### Überträger: Kaffeensäure

Die nach Zusatz von Kaffeensäure (3.4.-Dihydroxy-zimtsäure) zu beobachtende spontane, induktionszeitlose Sauerstoffabsorption ist einmal auf die Oxidation der Brenzkatechingruppierung der Kaffeensäure zum o-Chinon zurückzuführen, wie aus Abb. 27, Kurve b, ersichtlich ist. Die resultierende Kurve c zeigt ebenfalls eine spontane Sauerstoffabsorption. Dies war nach Zusatz der induktionszeitverkürzenden Kaffeensäure zu erwarten.

pH 5,8

Die Induktionsperiode war in dem p-Cumarsäure enthaltenden Ansatz deutlich verkürzt (auf ca. 30 Min.). Die drei Absorptionskurven verliefen ähnlich wie bei pH 4,5, jedoch war der Sauerstoffverbrauch erwartungsgemäß höher, da der pH-Wert im Optimum der Phenoloxidase lag.

pH 7,2

Der Kurvenverlauf glich im wesentlichen den obengenannten Kurven, es wurde jedoch eine größere Reaktivität der Reaktionsgemische beobachtet. Die Induktionszeit des Ansatzes mit p-Cumarsäure war beispielsweise nach 10-15 Minuten beendet, obwohl das Optimum der Phenoloxidase überschritten ist. Dies ist auf eine Verkürzung der Induktionszeit im alkalischen Medium zurückzuführen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in Gegenwart von p-Cumarsäure und Kaffeesäure eine Verstärkung der Oxidation durch die Überträgersubstanz stattgefunden hat.

### 8.1.2. Dünnschichtchromatographie.

pH 4,5 (Tab. 6 Nr. 5)

Chromatogramme wurden nach 5 und 30 Minuten sowie nach 2, 3 und 22 Stunden angefertigt. Chromatogramme, die keine Veränderungen im Vergleich zu den zeitlich davorliegenden aufwiesen, wurden nicht tabelliert.

| Nr. | 1  | 2    | 3  | 4  | 5    |    | 6    |      |     | 7    |      |     |
|-----|----|------|----|----|------|----|------|------|-----|------|------|-----|
| Zt. |    |      |    |    | 5'   | 2h | 5'   | 2h   | 22h | 5'   | 2h   | 22h |
| hRf |    | (63) |    |    |      |    |      |      | 60  |      | (60) | 60  |
|     | 52 | 52   |    |    | 52   | 52 | 52   | 52   | 52  | 52   | 52   | 52  |
|     |    |      |    |    |      |    | 49   | 49   |     | 49   | 49   | 49  |
|     |    | 38   | 41 |    | 36   | 36 | 36   | 36   | ↑   | 36   | 36   | ↑   |
|     |    | 32   |    |    |      |    | ↑    | ↑    |     | (24) | ↑    | ↑   |
|     |    |      |    | 24 | (24) | 24 | (24) | (24) |     | (18) | ↓    | ↓   |
|     |    |      |    | 18 | (18) | 18 | (18) | ↓    | ↓   |      |      |     |
|     | 0  |      |    |    |      |    | 0    | 0    |     | 0    | 0    | 0   |

Nr. 1 O-Desmethyl-magnocurarin-bromid 19

Nr. 2 19, oxidiert mit Fe<sup>3+</sup>

Nr. 3 Laudanosolin-methobromid 8

Nr. 4 Aporphin 9 (Dehydrolaudanosolin-methobromid)

Nr. 5 Phenoloxidase/19

Nr. 6 Phenoloxidase/p-Cumarsäure/19

Nr. 7 Phenoloxidase/Kaffeesäure/19

O: am Start verbleibende Substanz

Doppelpfeil: Schwanzbildung

Tab. 6 Dünnschichtchromatographie bei pH 4,5  
Phenoloxidase/O-Desmethyl-magnocurarin-bromid 19

Nr. 1 O-Desmethyl-magnocurarin-bromid.

Der hRf-Wert der Ausgangsverbindung lag bei 52. Chromatographisch waren nach 22 Stunden keine Autoxidationsprodukte nachzuweisen.

Nr. 2 O-Desmethyl-magnocurarin-bromid/ $\text{Fe}^{3+}$ .

Durch Oxidation von O-Desmethyl-magnocurarin-bromid mit 1m Eisen-III-chloridlösung erhielt ich entsprechend BLASCHKE<sup>37)</sup> ein Gemisch aus Ausgangsverbindung, am Start verbleibenden Substanzen (vermutlich Polymere) und zwei Produkten mit den hRf-Werten 32 und 38. BLASCHKE identifizierte hRf 38 als die dimere, parallel verknüpfte Verbindung 33. Nach 22 Stunden zeigte die Lösung eine weitere Zone mit hRf 63.

Nr. 3 Laudanosolin-methobromid.

Es wurde als Vergleichssubstanz eingesetzt. Der hRf-Wert lag bei 41. Die wässrige Lösung war instabil, nach 22 Stunden waren Autoxidationsprodukte mit den hRf-Werten 18 und 24 nachweisbar.

Nr. 4 Aporphin 9 (Dehydrolaudanosolin-methobromid).

Durch Oxidation von Laudanosolin-methobromid mit 1m Eisen-III-chloridlösung wurde nach FRANCK<sup>4)</sup> das Aporphin 9 erhalten. Die Substanz wurde im Verteilungschromatogramm in zwei intensitätsgleiche Zonen mit den hRf-Werten 18 und 24 getrennt. Hierbei handelt es sich um eine Racemattrennung, wie von KIKKAWA<sup>54)</sup> vermutet und von TIETZE<sup>41)</sup> bewiesen werden konnte.

Nr. 5 Phenoloxidase/O-Desmethyl-magnocurarin-bromid.

Die nach 5 Minuten nur schwach detektierbaren Zonen verstärkten sich innerhalb von 2 Stunden. Im Mischchromatogramm mit dem Aporphin 9 erfolgte keine weitere Auftrennung. Die Zonen hRf 18 und 24 blieben deckungsgleich. So liegt die Vermutung nahe, daß zunächst eine Hydroxylierung des Substrats und anschließend eine Oxidation eingetreten ist. Laudanosolin-methobromid als intermediäres Reaktionsprodukt kann in diesem System sicherlich nicht abgefangen

werden, da es, wie FRÖMMING<sup>21)</sup> zeigte, von Phenoloxidase sofort angegriffen wird.

Die nach 5 Minuten Reaktionszeit DRAGENDORFF-positive Zone hRf 36 war nicht identisch mit hRf 38, der dimeren, parallel verknüpften Verbindung 33 (s.o. Nr. 2), wie aus dem Mischchromatogramm hervorging. Die Bildung anderer Dimerer nach dem A-B-Schema (s. S.24) ist jedoch nicht ausgeschlossen.

Nr. 6 Phenoloxidase/p-Cumarsäure/O-Desmethyl-magnocurarin-bromid. Nach 5 Minuten konnten, wie in dem System ohne Überträger-substanz, (Nr. 5 ), folgende Substanzen neben der Ausgangs-verbindung nachgewiesen werden: hRf 18, 24 und 36. Nach 2 Stunden war der untere DC-Bereich infolge Schwanzbildung undifferenzierbar. Als neue Zone waren hRf 49 und nach 22 Stunden hRf 60 zu verzeichnen. Beide enthielten sowohl Stickstoff als auch Phenylhydroxyle, wie die Detektion ergab.

Insgesamt verliefen die Reaktionen in diesem System wesentlich schneller als ohne Überträger, was der Theorie entsprechend auf die Verkürzung der Induktionszeit durch p-Cumarsäure zurückzuführen ist.

Nr. 7 Phenoloxidase/Kaffeesäure/O-Desmethyl-magnocurarin-bromid. Die Reaktionszeiten waren stark verkürzt. Bereits nach 5 Minuten war hRf 49 neben hRf 18, 24 und 36 nachweisbar, Verbindung hRf 60 bereits nach zwei Stunden. Die Verkürzung bzw. Aufhebung der Induktionszeit ist durch das Vorhandensein der Kaffeesäure bedingt.

pH 5,8 und 7,2.

Je weiter sich der pH-Bereich zum Basischen hin verschob, desto rascher verliefen die Reaktionen. In beiden pH-Bereichen wurden gleiche Chromatogramme gefunden.

Bemerkenswert ist, daß trotz verstärkter Reaktivität die Schwanzbildung verzögert wurde.

Zum Vergleich der zeitlichen Verschiebungen wurden die hRf-Werte in diesen beiden pH-Bereichen in Tabelle 7 aufgenommen.

| Nr. | 1  | 2    | 3  | 4  | 5  | 6    |     |      | 7    |     |      |
|-----|----|------|----|----|----|------|-----|------|------|-----|------|
| Zt. |    |      |    |    | 5' | 5'   | 30' | 22h  | 5'   | 30' | 22h  |
| hRf |    | (63) |    |    |    | 60   | 60  | 60   | (60) | 60  | 60   |
|     | 52 | 52   |    |    | 52 | 52   | 52  | 52   | 52   | 52  | 52   |
|     |    |      |    |    |    | (49) | 49  | (49) | 49   | 49  | (49) |
|     |    |      | 41 |    |    |      |     | ↕    |      |     | ↕    |
|     |    | 38   |    |    |    |      |     |      |      |     |      |
|     |    |      |    |    | 36 | 36   | 36  | ↕    | 36   | 36  | ↕    |
|     |    | 32   |    |    |    |      |     |      |      |     |      |
|     |    |      |    | 24 | 24 | 24   | 24  | (24) | 24   | 24  | (24) |
|     |    |      |    | 18 | 18 | 18   | 18  | (18) | 18   | 18  | (18) |
|     |    | 0    |    |    |    |      | 0   | 0    |      | 0   | 0    |

Nr. 1 O-Desmethyl-magnocurarin-bromid 19

Nr. 2 19, oxidiert mit  $\text{Fe}^{3+}$

Nr. 3 Laudanosolin-methobromid

Nr. 4 Aporphin 9 (Dehydrolaudanosolin-methobromid)

Nr. 5 Phenoloxidase/19

Nr. 6 Phenoloxidase/p-Cumarsäure/19

Nr. 7 Phenoloxidase/Kaffeesäure/19

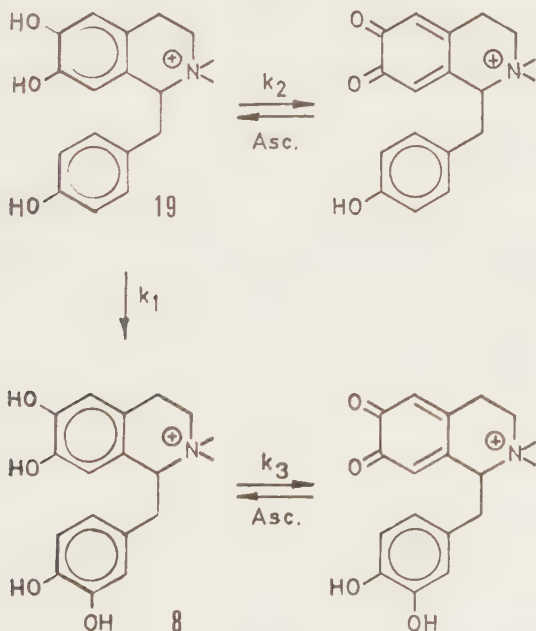
O: am Start verbleibende Substanz

Doppelpfeil: Schwanzbildung

Tab. 7 Dünnschichtchromatographie bei pH 5,8 und 7,2  
Phenoloxidase/O-Desmethyl-magnocurarin-bromid 19

# Enzymatische Oxidation in Anwesenheit von Ascorbinsäure.

Eine Möglichkeit, das bei der enzymatischen Hydroxylierung von O-Desmethyl-magnocurararin-bromid gebildete Laudanosolin-methobromid abzufangen, sollte der Zusatz von Ascorbinsäure zur Substratlösung bringen. Durch das niedrige Redoxpotential der Ascorbinsäure wird das nach der Hydroxylierung oxidativ gebildete o-Chinon sofort wieder zum Laudanosolin-methobromid 8 reduziert, so daß in der Reaktionslösung außer Laudanosolin-methobromid kein anderes Reaktionsprodukt vorliegen sollte, sofern die Oxidation über Chinonzwischenstufen verläuft (Abb. 29).



Asc: Zusatz von Ascorbinsäure

$k_1$ : Geschwindigkeitskonstante der "Cresolase-Aktivität"

$k_2, k_3$ : Geschwindigkeitskonstanten der "Catecholase-Aktivität"

Abb. 29

Reaktionsschema des Systems Phenoloxidase/  
O-Desmethyl-magnocurararin-bromid/Ascorbinsäure

Die Chinonbildung kann sowohl am Aromaten des Isochinolinringes, als auch am Benzylrest erfolgen. Chromatographisch konnte nach Zusatz eines großen Überschusses an Ascorbinsäure ein Reaktionsprodukt mit dem hRf-Wert 41 festgestellt werden. Dieser Wert entsprach dem des Laudanosolin-methobromids (Tab. 7, Nr. 3).

Es wurden nun mehrere Zonen mit dem hRf-Wert 41 eluiert, mit Phenoloxidase oxidiert und wiederum chromatographiert. Im Chromatogramm waren zwei sehr schwache Zonen mit den für das Aporphin 9 typischen hRf-Werten 18 und 24 sichtbar. Sie waren sowohl DRAGENDORFF- als auch Echtblausalz BB-positiv und wieser daher Amin- und Phenolcharakter auf.

Diese Versuche bestätigen eine Hydroxylierung und anschließende Oxidation des O-Desmethyl-magnocurarin-bromids über das Laudanosolin-methobromid zum Aporphin 9 .

### 8.1.3. UV-Spektroskopie.

Die Lösungen zu den Spektrenaufnahmen wurden nach Oxidationszeiten von 5 und 30 Minuten sowie nach 2 Stunden den DC-Reaktionsansätzen entnommen und in n HCl/Methanol (1+9) gemessen. Zunächst wurde die Absorption der gesamten Substratlösung aufgenommen; in ausgewählten Fällen erfolgte die Messung der DC-Eluat.

Eine Übersicht der Absorptionsmaxima bringt Tabelle 8.

pH 4,5

Nr. 1 O-Desmethyl-magnocurarin-bromid (Abb. 30).

$\lambda$  max 220 und 285 nm. Die Lage der Maxima veränderte sich innerhalb von 22 Stunden nicht.

Die intensive Bande bei 220 nm ist den Phenylhydroxylen zuzuordnen, durch Übergang eines p-Elektrons des Sauerstoffs in das  $\pi$ -Orbital des Ringes.

In Strukturen mit Brenzkatechingruppierungen, wie Laudanosolin, Isolaudanosolin, Kaffeesäure, war dieses Maximum nicht vorhanden. Man könnte dies darauf zurückführen, daß

hier Wasserstoffbrückenbindungen die freien Elektronenpaare beanspruchen, die damit nicht mehr für den Ring zur Verfügung stehen.

Nr. 2 O-Desmethyl-magnocurarin-bromid/ $\text{Fe}^{3+}$ .

Das Reaktionsgemisch, das bei der Oxidation von O-Desmethyl-magnocurarin-bromid mit Eisen-III-chloridlösung nach BLASCHKE<sup>37)</sup> erhalten wurde, zeigte ein Maximum von geringer Intensität bei 230 nm.

Nr. 3 Laudanosolin-methobromid.

$\lambda_{\text{max}}$  286 nm.

Nr. 4 Aporphin <sup>9</sup> (Dehydrolaudanosolin-methobromid).

Erhalten durch Oxidation von Laudanosolin-methobromid mit Eisen-III-chloridlösung.  $\lambda_{\text{max}}$  285 und 308 nm. Diese Werte entsprechen der Literatur<sup>4)</sup> (Abb. 30).

Wurde Laudanosolin-methobromid mit Phenoloxidase oxidiert, konnten ebenfalls Maxima bei 285 und 308 nm erhalten werden (Abb. 30).

Nr. 5 Dünnschichtchromatographie von Aporphin <sup>9</sup>.

Die durch Elution der Zonen hRf 18 und 24 gewonnenen Lösungen zeigten ebenfalls ein Maximum bei 285 nm und eine Schulter bei 308 nm.

Nr. 6 Phenoloxidase/O-Desmethyl-magnocurarin-bromid.

5 Minuten nach der Enzymzugabe konnte nur Ausgangssubstanz festgestellt werden. Im Dünnschichtchromatogramm waren zu diesem Zeitpunkt bereits schwach sichtbare Reaktionsprodukte zu verzeichnen, die ich auf eine Oxidation während der Chromatogrammbearbeitung zurückführe.

Nach 30 Minuten konnten Maxima bei 220-225 und 285 nm gemessen werden sowie eine schwache Schulter bei 308 nm, die sich im Verlauf von 3 Stunden verstärkte (vgl. Abb. 30). Ebenfalls Maxima bei 285 und 308 nm wies das definierte Aporphin <sup>9</sup> auf.

Um die Hypothese der Hydroxylierung und anschließenden

Oxidation zu konkretisieren, wurden die Zonen hRf 18 und 24 des Dünnschichtchromatogrammes (Tab. 7, Nr. 5) eluiert. Sie zeigten ein Maximum bei 285 und eine Schulter bei 308 nm.

Phenoloxidase/p-Cumarsäure/O-Desmethyl-magnocurarin-bromid. Bereits nach 5 Minuten zeigte das Spektrum Maxima bei 220-225 (sh), 285, 308 (sh) nm. Innerhalb von 3 Stunden veränderte sich die Lage der Maxima nicht.

Phenoloxidase/Kaffeesäure/O-Desmethyl-magnocurarin-bromid. Nach einer Reaktionszeit von 5 Minuten ergab sich folgendes Spektrum:  $\lambda$  max 220, 285 und 308 (sh) nm. Die Extinktion der Banden war zu diesem Zeitpunkt schon gering, nach 1 Stunde waren die Maxima verschwunden.

pH 5,8 und 7,2

Abgesehen von einer zeitlichen Verschiebung wurden die gleichen Ergebnisse erzielt.

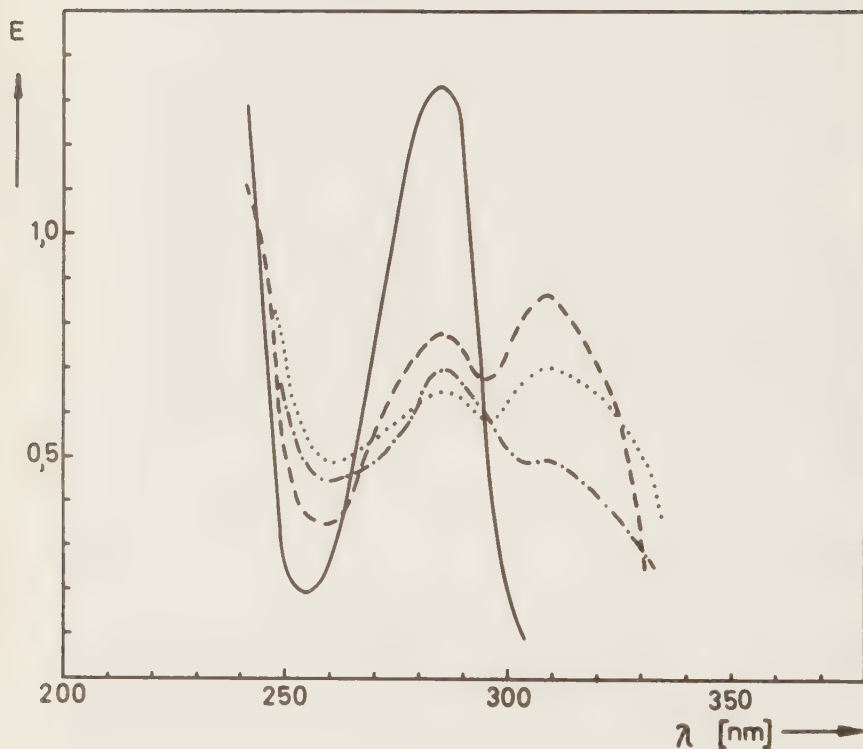
Man kann somit aufgrund der Übereinstimmung der Daten des definierten Aporphins 9 mit den Daten, die bei der durch Phenoloxidase katalysierten Oxidation von O-Desmethyl-magnocurarin-bromid erhalten wurden, vermuten, daß zumindest ein Teil des eingesetzten O-Desmethyl-magnocurarin-bromids hydroxyliert und anschließend zum Aporphin 9 oxidiert wurde. Die Versuchsreihen, die Ascorbinsäure enthielten, zeigen dies noch deutlicher (vgl. S.59).

| Nr. | Zeit | Überträger | $\lambda$ max in nm |     |     |       |     |
|-----|------|------------|---------------------|-----|-----|-------|-----|
| 1   |      | -          | 220                 | -   | 285 | -     | -   |
| 2   |      | -          | 230                 | -   | -   | -     | -   |
| 3   |      | -          | -                   | -   | 286 | -     | -   |
| 4   |      | -          | -                   | -   | 285 | 308   | -   |
| 5   |      | -          | -                   | -   | 285 | (308) | -   |
| 6   | 5'   | -          | 220                 | -   | 285 | -     | -   |
|     | 30'  | -          | 220-5               | -   | 285 | (308) | -   |
|     | 5'   | pC         | (220-5)             | -   | 285 | (308) | -   |
|     | 5'   | Ksr        | 220                 | -   | 285 | (308) | -   |
| 7   | 30'  | -          | 220                 | -   | 285 | -     | -   |
| 8   | 30"  | -          | 220                 | -   | 285 | -     | -   |
|     | 5'   | -          | 220                 | -   | 285 | -     | -   |
|     | 1h   | -          | 220-5               | 280 | -   | -     | 320 |

- Nr. 1 O-Desmethyl-magnocurarin-bromid 19  
 Nr. 2 O-Desmethyl-magnocurarin-bromid/ $\text{Fe}^{3+}$   
 Nr. 3 Laudanosolin-methobromid 8  
 Nr. 4 Aporphin 9 (Dehydrolaudanosolin-methobromid)  
 Nr. 5 DC-Eluat von 9 hRf 18 und 24  
 Nr. 6 Phenoloxidase/19  
 Nr. 7 Laccase/19  
 Nr. 8 Peroxidase/ $\text{H}_2\text{O}_2$ /19  
 pC: p-Cumarsäure  
 Ksr: Kaffeesäure  
 ( ): Schulter

Tab. 8

UV-Spektroskopie bei pH 4,5  
 Enzym/O-Desmethyl-magnocurarin-bromid 19



- O-Desmethyl-magnocurarin-bromid 19  
----- Aporphin 9 (Dehydrolaudanosolin-methobromid)  
..... Phenoloxidase/Laudanosolin 8  
-.-.-.- Phenoloxidase/O-Desmethyl-magnocurarin-bromid

Abb. 30      UV-Spektroskopie bei pH 4,5

## 8.2. Laccase.

Hydroxylierungsreaktionen der Laccase sind nicht bekannt, auch nicht in Gegenwart von Überträgersubstanzen. Es wurde daher mit einem Angriff auf die o-Dihydroxygruppierung des Isochinolin-teils gerechnet.

Die Untersuchungen ergaben, daß O-Desmethyl-magnocurarin-bromid durch die Laccase bei einem pH-Wert von 4,5 nicht angegriffen wird. Bei pH 5,8 war nach 24 Stunden eine leichte Braunfärbung der Reaktionslösung zu erkennen und dünnschichtchromatographisch sehr schwache Zonen mit den hRf-Werten 49 und 60 neben Ausgangssubstanz nachweisbar. Eine Verschiebung des Reaktionsmilieus zum Alkalischen (pH 7,2), hatte eine raschere Oxidierbarkeit zur Folge. Die Verbindungen hRf 49 und 60 konnten bereits nach 30 Minuten abgefangen werden. Nach 24 Stunden war der untere DC-Bereich infolge Schwanzbildung undifferenzierbar. Ausgangssubstanz war nicht vorhanden, die Reaktionsprodukte mit den hRf-Werten 49 und 60 konnten nicht mehr nachgewiesen werden.

Auch die UV-spektroskopische Untersuchung brachte keinen Hinweis auf die Struktur der Oxidationsprodukte. Außer der Extinktionsabnahme des Hauptmaximums des O-Desmethyl-magnocurarin-bromids war keine Veränderung zu beobachten.

## 8.3. Peroxidase/Wasserstoffperoxid.

Die Oxidation setzte außerordentlich rasch ein. In den drei pH-Bereichen 4,5 5,8 und 7,2 waren nach einer Reaktionszeit von 3 Minuten die Chromatogramme infolge Schwanzbildung im hRf-Bereich 0-60 undifferenzierbar. In sämtlichen Ansätzen wurden chromatographisch gleiche Oxidationsprodukte mit den hRf-Werten 27, 33, 39, 45 und 60 erhalten (vgl. Tab. 9 Nr. 6, Nr. 7).

Ausgangssubstanz war nach 30 Minuten nur noch bei pH 4,5 nachweisbar. Das pH-Optimum der Peroxidase lag in diesen Versuchsreihen bei pH 5,8. Die Reaktivität war in diesem Bereich am größten (Tab. 9, Nr. 7).

| Nr.  | 1  | 2    | 3  | 4  | 6    | 7   |
|------|----|------|----|----|------|-----|
| Zeit |    |      |    |    | 30"  | 15" |
| hRf  |    | (03) |    |    | (60) | 60  |
|      | 52 | 52   |    |    | (52) |     |
|      |    |      | 41 |    | 45   | 45  |
|      |    |      |    |    | 39   | 39  |
|      |    | 38   |    |    | 33   | 33  |
|      |    | 32   |    |    | 27   | 27  |
|      |    |      |    | 24 |      |     |
|      |    |      |    | 18 |      |     |

Nr. 1 O-Desmethyl-magnocurarin-bromid 19

Nr. 2 19 /Fe<sup>3+</sup>

Nr. 3 Laudanosolin-methobromid 8

Nr. 4 Aporphin 9 (Dehydrolaudanosolin-methobromid)

Nr. 6 Peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/19 , pH 4,5

Nr. 7 Peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/19 , pH 5,8

Tab. 9 Dünnschichtchromatographie Peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/  
O-Desmethyl-magnocurarin-bromid 19

Die hRf-Werte 33 und 39 waren nicht identisch mit den hRf-Werten 32 und 38, die bei der Oxidation von O-Desmethyl-magnocurarin-bromid mit Eisen-III-chloridlösung erhalten wurden (Tab. 6, Nr. 2). Demnach ist auch bei der Peroxidase-katalysierten Oxidation von O-Desmethyl-magnocurarin-bromid nicht das dimere, parallel verknüpfte Alkaloid vom Berbamin-Typ 33 entstanden.

### 8.3.2. UV-Spektroskopie.

Die Aufnahmen der Spektren erfolgten nach 30 Sekunden, 3 Minuten und 1 Stunde. Als Lösungsmittel diente n HCl/Methanol (1+9). Die Ergebnisse der verschiedenen pH-Bereiche waren einheitlich und sind in Tab. 8, Nr. 8 zusammengefaßt.

Die Extinktionen der Ausgangsverbindungen  $\lambda_{\max}$  220 und 265 nm hatten nach 5 Minuten stark an Intensität verloren. Auffallend war eine Blauverschiebung des Hauptmaximums um 5 nm nach 280 nm und das gleichzeitige Auftreten eines Maximums, bzw. einer Schulter bei 320 nm, und zwar bei pH 4,5 nach 1 Stunde, bei pH 5,8 und 7,2 bereits nach 5 Minuten.

Durch Zusatz von Dihydroxyfumarsäure zur Substratlösung sollte geprüft werden, ob eine Hydroxylierung des O-Desmethyl-magnocurarin-bromids in Gegenwart von Peroxidase und Dihydroxyfumarsäure möglich ist. Der Sauerstoff der neuen Hydroxylgruppe stammt dabei aus der Luft und nicht aus dem Wasser<sup>68)</sup>.

Der Eintritt der neuen Hydroxylgruppe richtet sich nach BUHLER und MASON<sup>69)</sup> nach der Elektronendichte am aromatischen Ring. Übt der erste Substituent am Ring einen +M-Effekt aus, so tritt das Hydroxyl bevorzugt in o- oder p-Stellung ein, bei einem -M-Effekt in m-Stellung. Es wurde daher für das O-Desmethyl-magnocurarin-bromid eine Substitution am C<sub>2</sub>, oder C<sub>6</sub>, erwartet, so daß als Hydroxylierungsprodukt das Laudanosolin-methobromid vorliegen sollte.

Die Untersuchungen wurden in den drei pH-Bereichen 4,5 5,8 und 7,2 durchgeführt und 24 Stunden beobachtet. Während der Versuchsdauer konnten weder dünn-schichtchromatographisch noch UV-spektroskopisch Reaktionsprodukte nachgewiesen werden, auch nicht bei Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen an Peroxidase und Dihydroxyfumarsäure. In dem System Peroxidase/Dihydroxyfumarsäure/O-Desmethyl-magnocurarin-bromid erfolgte demnach keine Hydroxylierung zum Laudanosolin-methobromid.

Zusammenfassend kann gesagt werden: Phenoloxidase, Laccase und Peroxidase/ $H_2O_2$  oxidieren O-Desmethyl-magnocurarin-bromid. Die Oxidation durch Laccase setzte in den gewählten Versuchsbedingungen erst bei pH 5,8 und mit verzögerter Oxidationsgeschwindigkeit ein.

Im Dünnschichtchromatogramm konnten bei der durch Phenoloxidase katalysierten Oxidation Zonen mit den  $R_f$ -Werten 18 und 24 festgestellt werden. Diese stimmten mit denen des Aporphins 9 (Dehydrolaudanosolin-methobromid) überein und waren auch durch das Mischchromatogramm nicht trennbar. Durch Zusatz von Ascorbinsäure zur Substratlösung konnte ein Reaktionsprodukt mit dem  $R_f$ -Wert 41 abgefangen werden, das durch Oxidation des DC-Eluates als Laudanosolin-methobromid bestimmt werden konnte. Aus diesen Versuchen läßt sich ableiten, daß O-Desmethyl-magnocurarin-bromid durch die Phenoloxidase zum Laudanosolin-methobromid hydroxyliert und dann zum Aporphin 9 oxidiert wird (Abb. 13). Auch die UV-spektroskopischen Untersuchungen bestätigen diese Ergebnisse.

Laccase und Peroxidase/Wasserstoffperoxid katalysierten Reaktionen, deren Produkte unbekannt blieben. Die dimere Verbindung 33 vom Berbamin-Typ, die nach BLASCHKE<sup>37)</sup> bei der Oxidation von O-Desmethyl-magnocurarin-bromid mit  $Fe^{3+}$  entstand, war in keinem der enzymkatalysierten Systeme enthalten.

Zusatz von Dihydroxyfumarsäure zu dem System Peroxidase/O-Desmethyl-magnocurarin-bromid hatte keine Hydroxylierung zum Laudanosolin-methobromid zur Folge.

## EXPERIMENTELLER TEIL

|                                                                     | Seite |
|---------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. Allgemeine Angaben                                               | 70    |
| 2. Synthese von Isolaudanosolin-methobromid                         | 71    |
| 3. Synthese von O-Desmethyl-magnocurararin-bromid                   | 76    |
| 4. Oxidationen mit Eisen-III-chlorid                                | 79    |
| 4.1. Dehydro-isolaudanosolin-methochlorid                           | 79    |
| 4.2. Oxidation von O-Desmethyl-magnocurararin-bromid                | 79    |
| 4.3. Dehydro-laudanosolin-methochlorid                              | 80    |
| 5. Enzympräparationen                                               | 81    |
| 5.1. Phenoloxidase-Stammlösung                                      | 81    |
| 5.2. Laccase                                                        | 82    |
| 5.3. Peroxidase                                                     | 82    |
| 6. Enzymatische Oxidation von (+)-Isolaudanosolin-methobromid       | 83    |
| 7. Enzymatische Oxidation von (+)-O-Desmethyl-magnocurararin-bromid | 88    |
| Zusammenfassung                                                     | 93    |
| LITERATURVERZEICHNIS                                                | 96    |

# 1. Allgemeine Angaben.

Schmelzpunkte: Lindström-Gerät, unkorrigiert in °C.

UV-Spektren: Zeiss-Spektralphotometer M 4 Q II (in den angegebenen Lösungsmitteln)

IR-Spektren: Perkin-Elmer-Spektralphotometer 237 und 421 (in KBr).

Analysen: Mikroanalysen wurden im Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin und teilweise vom Mikroanalytischen Laboratorium I. Beetz, Kronach/OFR., durchgeführt.

Die Ausbeuten beziehen sich auf zweimal umkristallisierte und getrocknete Reaktionsprodukte.

Dünnschichtchromatographie zur Reinheitsprüfung:

Plattengröße 20 x 20 cm. Die Beschichtung erfolgte mit dem Streichgerät nach STAHL (Fa. DESAGA). Die Schichtdicke betrug ca. 0,25 mm.

Sorbens: Kieselgel GF 254 "Merck".

Fließmittel: Menge 100 ml

a. für primäre, sekundäre, tertiäre Basen und Amide:

Chloroform/Methanol (19:1).

b. für quaternäre Basen: Methanol/2n wässrige Salzsäure (2:1).

Detektion:

a. Diazotierte Sulfanilsäure (PAULY's Reagens<sup>55)</sup>) für Phenole.  
b. Jodplateat<sup>56)</sup> für Phenole.

c. DRAGENDORFF's Reagens mod. nach MURNIER<sup>57)</sup> für stickstoffhaltige Verbindungen. Vor Gebrauch wurde ein Teil Stammlösung mit drei Teilen Wasser verdünnt.

Kammersättigung: 1/2 Stunde. Die Kammern wurden mit einem 20 x 60 cm großen Filtrierpapierstreifen ringförmig ausgelegt.

Laufhöhe: 10 cm.

Die manometrischen Messungen wurden in der WARBURG-Apparatur<sup>58)59)</sup> der Fa. Braun/Melsungen durchgeführt.

Schüttelfrequenz: 90/min.

Reaktionstemperatur: 25°

2. Synthese von (+)-Isolaudanosolin-methobromid 18  
[1-(3.4-Dihydroxybenzyl)-5.6-dihydroxy-2-methyl-1.2.3.4-  
tetrahydro-isochinolin-methobromid]

### 2.3-Dimethoxy- $\omega$ -nitrostyrol 45 46)

Durch Kondensation von 30 g 2.3-Dimethoxy-benzaldehyd 44 mit 15 ml (20,5 g) Nitromethan bei -5 bis -10° in Anwesenheit äthanolischer Kalilauge wurde das wasserlösliche Produkt erhalten, das nach Einfließenlassen in verdünnte Schwefelsäure ausfiel. Aus Äthanol umkristallisiert, gelbgrüne Nadeln.

Ausbeute 31 g = 81,5 %. Insgesamt wurden 150 g 44 umgesetzt.

Fp 87° (Lit. Fp. 87-88°) 37)

$C_{10}H_{11}O_4N$  (209,1)

Durch Anlagerung von Wasser an die Doppelbindung entsteht der Nitrolalkohol. Farblose Nadeln, Fp 65°.

### $\beta$ -(2.3-Dimethoxyphenyl)-aethylamin 46

Die Reduktion von 45 zu 46 erfolgte analog einer Vorschrift von SLOTTA und SZYSKE<sup>49)</sup> elektrolytisch an Bleielektroden. Die Reaktionsdauer betrug 24 Std. bei ca. 6 Volt und 5-6 Ampère. Die Reaktionstemperatur betrug in den ersten 12 Std. 20°, danach 40°.

Ausbeute an freiem Amin nach der Reinigung durch Vakuumdestillation: 61 %.

$C_{10}H_{11}NO_2$  (181,1)

Die Reduktion von 45 zu 46 mit  $LiAlH_4$  in Tetrahydrofuran wurde nach FINKELSTEIN<sup>47)</sup> durchgeführt.

Ausbeute 88 %.

Zur Darstellung größerer Mengen Amin wurde die elektrolytische Methode herangezogen.

### 3.4-Dimethoxyphenyl-essigsäure 49

Nach GREWE und FISCHER<sup>50)</sup> wurden 152 g Iovanillin<sup>47</sup> mit 300 ml wässriger NaHSO<sub>3</sub>-Lösung (40 %) bei -5° in das wasserlösliche Hydrogensulfit überführt, dieses ergab mit 130 g Kaliumcyanid das 3-Hydroxy-4-methoxy-mandelsäurenitril<sup>48</sup>. Das Nitril wurde in 3 Ansätzen von je 44,8 g mit jeweils 84,5 g Zinn-II-chlorid in stark saurem Milieu reduziert, vom Pinksalz abfiltriert und das Filtrat im Perforator durch Chloroform extrahiert. Methylierung mit Dimethylsulfat<sup>60)</sup> lieferte die 3.4-Dimethoxyphenyl-essigsäure <sup>49</sup>. Umkristallisation aus Essigester/Ligroin. Ausbeute 68,5 % bezogen auf Iovanillin.

Fp 97° (Lit. Fp. 97°) <sup>37)</sup>

C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub> (198,0)

Aus Wasser kristallisierte die Säure als Hydrat aus. Fp 80°

### N-[β-(2.3-Dimethoxyphenyl)-aethyl]-3.4-dimethoxyphenyl-acetamid 50

In Anlehnung an<sup>50)</sup> wurden 36,2 g Amin<sup>46</sup> und 42,2 g Säure<sup>49</sup> in 180 ml Xylol (trocken) gelöst und solange am Wasserabscheider unter Rückfluß erhitzt, bis 3,6 ml Wasser abgespalten waren (ca. 3 Std.). Nach Erkalten der Lösung kristallisierte das Amid aus. Die Umkristallisation aus Benzol/Petroläther ergab farblose Nadeln<sup>+</sup>. Ausbeute 70 %.

Fp 77° (Lit. Fp. 77°) <sup>37)</sup>

C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub> (359,4)

Ber. C 66,83 H 7,01 N 3,92

Gef. C 66,78 H 6,97 N 4,35

### 1-(3.4-Dimethoxybenzyl)-5.6-dimethoxy-2-methyl-3.4-dihydroisochinolin-Hydrochlorid 51

Ringschluß nach BISCHLER-NAPIERALSKI

24,2 g Säureamid <sup>50</sup> wurden in 180 ml Chloroform (gereinigt)<sup>++</sup>

<sup>+</sup> das Amid erwies sich als stark schleimhautreizend

<sup>++</sup> das Chloroform wurde zur Entfernung von Äthanol mit einer gesättigten wässrigen Calciumchlorid-Lösung geschüttelt und über wasserfreiem Calciumchlorid destilliert.

gelöst und mit 35 ml Phosphoroxyltrichlorid (frisch destilliert) solange unter Rückfluß erhitzt, bis die HCl-Entwicklung merklich nachließ (ca. 8 Stunden). Lösungsmittel, überschüssiges  $\text{POCl}_3$  sowie dessen Hydrolyseprodukte wurden soweit wie möglich im Vakuum abgedampft (Badtemperatur max.  $80^\circ$ ), der Rückstand noch zweimal in Chloroform aufgenommen und erneut abdestilliert. Verbindung 51 lag als dunkelbraunes, zähes Öl vor.

Identifizierung von 51 als Hydroperchlorat<sup>61)</sup>.

Eine Probe von 51 in Äthanol wurde bis zur quantitativen Fällung mit wässriger Perchlorsäure, 60 %ig, versetzt.

Umkristallisation aus Dimethylformamid/Benzol ergab gelbe Kristalle.

|                                                   |                            |
|---------------------------------------------------|----------------------------|
| Fp ab $250^\circ$ (Zers.)                         | Ber. C 54,40 H 5,44 N 3,83 |
| $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{ClNO}_8$ (441,6) | Gef. C 54,32 H 5,68 N 3,76 |

IR (KBr):  $1565\text{ cm}^{-1}$ . Charakteristische Bande für Dihydro-isochinoline.

1-(3.4-Dimethoxybenzyl)-5.6-dimethoxy-2-methyl-3.4-dihydro-isochinolin 52 und -Methojodid 53.

---

Zu der Lösung des öligen Dihydro-isochinolin-Hydrochlorids 51 in 160 ml Äthanol abs. tropfte man unter Rühren eine Lösung von 1,3 g Natrium in 50 ml Äthanol abs.<sup>47)</sup> bis zur bleibenden alkalischen Reaktion (Indikator). Der Verbrauch von Alkoholat war bei verschiedenen Reaktionsansätzen unterschiedlich, da er von restlichem  $\text{POCl}_3$  und dessen Hydrolyseprodukten bestimmt wurde. Die Quaternierung des Imins zum Immoniumsalz erfolgte durch Zutropfen von 25 ml Methyljodid und zweistündigem Erhitzen unter Rückfluß. Nach Abdampfen des Filtrats wurde der in Wasser aufgenommene Rückstand mit Chloroform extrahiert, getrocknet und abgedampft. Das gelbe, ölige Immoniumjodid lag in 82 %iger Ausbeute vor.

Die Arbeiten wurden unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

1-(3.4-Dimethoxybenzyl)-5.6-dimethoxy-2-methyl-1.2.3.4-tetrahydro-isochinolin 54

---

Die Immoniumverbindung 53, in 100 ml Methanol gelöst, wurde unter Stickstoff durch portionsweise Zugabe von 10 g Natriumborhydrid zur tertiären Base reduziert. Danach wurde 1/2 Std. unter Rühren am Rückfluß erhitzt. Die entstandene Mischung aus festen, flüssigen und öligen Anteilen wurde abgedampft, in 100 ml Wasser und 10 ml n Natronlauge aufgenommen und mit 3 x 150 ml Benzol extrahiert. Nach Abdampfen der getrockneten Benzolphasen wurde der hellgelbe, ölige Rückstand in wenig trockenem Aceton gelöst. Über Nacht kristallisierten in der Kälte derbe farblose Rhomben aus.

Umkristallisation aus Aceton.

|                                                         |                            |
|---------------------------------------------------------|----------------------------|
| Fp 79-80°                                               | Ber. C 70,50 H 7,58 N 3,92 |
| C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub> (357,1) | Gef. C 70,47 H 7,37 N 4,06 |

IR (KBr): Fehlen der Bande bei 1565 cm<sup>-1</sup>.

Da diese Verbindung in der Literatur<sup>37)</sup> als Öl beschrieben ist, wurde sie zusätzlich als Pikrat identifiziert.

Feine gelbe Nadeln nach der Umkristallisation aus Aceton.

Fp 187°

C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>4</sub>·C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> (586,6)

Ber. C 55,30 H 5,16 N 9,55

Gef. C 55,46 H 5,22 N 9,39

(+)-Isolaudanosin-methojodid 55

1-(3.4-Dimethoxybenzyl)-5.6-dimethoxy-2-methyl-1.2.3.4-tetrahydro-isochinolin-methojodid

---

Zur Quaternierung wurden 10 g 54 in 30 ml trockenem Aceton gelöst und mit frisch destilliertem Methyljodid 1 Stunde unter Rückfluß erhitzt. Innerhalb von 48 Std. kristallisierten farblose Prismen aus. Umkristallisation aus Methanol. Ausbeute 74 %.

Die Verbindung schmolz bei 192°. Zwischen 198 und 205° erstarrte sie kristallin, um bei 209° erneut vollständig zu schmelzen. Ver-

mutlich handelte es sich um die Umwandlung in eine andere Modifikation.

UV (Methanol)  $\lambda_{\max}$  281 nm

Die Substanz war chromatographisch einheitlich.

|                    |         |                            |
|--------------------|---------|----------------------------|
| $C_{22}H_{30}NO_4$ | (499,4) | Ber. C 53,00 H 6,01 N 2,80 |
|                    |         | Gef. C 52,99 H 5,96 N 2,92 |

(+)-Isolaudanosolin-methobromid 18

1-(3.4-Dihydroxybenzyl)-5.6-dihydroxy-2-methyl-1.2.3.4-tetrahydro-isochinolin-methobromid

---

Entmethylierung durch Bromwasserstoffsäure.

5 g Isolaudanosin-methojodid 55 wurden in 50 ml Bromwasserstoffsäure ( $D=1,49$ ) unter Stickstoff 12 Std. auf  $136^\circ$  erwärmt. Die hellbraune Lösung wurde nach dem Abkühlen im Vakuum bei einer maximalen Badtemperatur von  $90^\circ$  abgedampft. Der graue pulvrige Rückstand erwies sich als stark hygroskopisch und färbte sich an der Luft rasch dunkelbraun. Er wurde erneut in Bromwasserstoffsäure gelöst und abdestilliert. Nach der Umkristallisation aus Eisessig lag ein graues, amorphes Pulver vor, das gegenüber Luftfeuchtigkeit stabiler war. Rohausbeute 24 %.

Fp. Die Substanz begann bei  $118^\circ$  zu sintern und zeigte einen scharfen Schmelzpunkt bei  $136^\circ$  (Lit. 135-40<sup>37</sup>).

Entmethylierung durch Bortribromid<sup>52</sup>).

Die Suspension von 0,5 g Isolaudanosin-methojodid 55 in 30 ml Petroläther wurde auf  $-60^\circ$  (Aceton/Trockeneis) abgekühlt und tropfenweise unter Rühren mit 25 g Bortribromid (ebenfalls auf  $-60^\circ$  abgekühlt) versetzt. Nachdem sich der Reaktionsansatz auf Raumtemperatur erwärmt hatte, wurde er 72 Stunden unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit gerührt. Danach erneut auf  $-60^\circ$  gekühlt, wurde die Suspension auf einer Glasfritte rasch abgesaugt und anhaftendes Bortribromid im Rückstand mit Aceton zer setzt. Die Umkristallisation aus Eisessig ergab ein hellgraues Pulver. Die Substanz war chromatographisch einheitlich.

Fp. 136° (Sintern ab 122°)

UV (n HCl/Methanol 1+9)  $\lambda_{\max}$  285 nm

$C_{18}H_{22}BrNO_4$  (396,3)

Br. C 54,56 H 5,60 N 3,54

Gef. C 54,49 H 5,85 N 3,42

3. Synthese von (+)-O-Desmethyl-magnocurarin-bromid 19  
1-(4-Hydroxybenzyl)-6.7-dihydroxy-2-methyl-1.2.3.4-  
tetrahydro-isochinolin-bromid.

N-[ $\beta$ -(3.4-Dimethoxyphenyl)-aethyl-]4-methoxyphenyl-acetamid 59

18,1 g  $\beta$ -(3.4-Dimethoxyphenyl)-aethylamin (Homoveratrylamin) 57  
und 16,6 g 4-Methoxyphenyl-essigsäure 58 wurden in 90 ml Xylol  
solange am Wasserabscheider gekocht, bis die berechnete Menge  
Wasser (1,8 ml) abgespalten war<sup>50)</sup> (ca. 5-6 Std.).

Umkristallisation aus Benzol ergab farblose Kristalle.

Fp 123,5-124° (Lit.Fp.126°)<sup>61)</sup>

$C_{19}H_{23}NO_4$  (329,1)

Ber. C 69,25 H 6,99 N 4,26

Gef. C 69,25 H 7,13 N 4,39

1-(4-Methoxybenzyl)-6.7.-dimethoxy-3.4-dihydro-isochinolin-  
Hydrochlorid 60

Ringschluß nach BISCHLER-NAPIERALSKI

20 g Säureamid 59 wurden in 150 ml gereinigtem Chloroform ge-  
löst und mit 24 ml Phosphoroxetrylchlorid 10 Stunden unter Rück-  
fluß erhitzt. Nach dem Abdampfen lag eine ölig-kristalline,  
gelbbraune Masse vor. Dreimaliges umkristallisieren aus Äthanol  
ergab blaßgelbe Kristalle.

Fp 206°

$C_{19}H_{22}ClNO_3$  (347,6)

IR (KBr): 1560  $cm^{-1}$  (Dihydro-isochinolin)

Durch Luftsauerstoff tritt unter Braunfärbung Oxidation zur  $\alpha$ -Ketoverbindung ein.

Identifizierung von 60 als Hydroperchlorat<sup>61)</sup>.

Eine Probe von 60 wurde in wenig Aceton gelöst und mit einigen Tropfen Perchlorsäure (60 %) versetzt. Nach der Umkristallisation aus reichlich Äthanol lagen farblose Kristalle vor.

Fp 216° (Zers.)

C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>ClNO<sub>7</sub> (411,6)

Ber. C 55,50 H 5,35 N 3,40

Gef. C 55,37 H 5,53 N 3,30

1-(4-Methoxybenzyl)-6.7-dimethoxy-3.4-dihydro-isochinolin 61 und -Methojodid 62 .

---

Beide Verbindungen wurden in Analogie zu Verbindung 53 dargestellt. Da das eingesetzte Dihydro-isochinolin-Hydrochlorid 60 kristallin vorlag, konnte mit der berechneten Menge Alkoholat gearbeitet werden. Nach der Methylierung des Imins kristallisierte das Immoniumsalz 62 über Nacht in der Kälte körnig, gelbbraun aus. Das oxidationsempfindliche Reaktionsprodukt wurde scharf abgesaugt, mit wenig abs. Äthanol gewaschen, kurz zwischen Filtrierpapier getrocknet und sofort weiterverarbeitet.

1-(4-Methoxybenzyl)-6.7-dimethoxy-2-methyl-1.2.3.4-tetrahydro-isochinolin 63

---

Das Immoniumjodid 62 wurde in 150 ml Methanol gelöst und mit 12 g Natriumborhydrid analog Verbindung 54 hydriert und isoliert. Das hellgelbe Öl wurde in wenig trockenem Aceton gelöst. Nach kurzer Zeit kristallisierten farblose Rhomben aus. Umkristallisation aus Aceton. Ausbeute 85 %.

Fp 89°

C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>3</sub> (327,0)

Ber. C 73,48 H 7,64 N 4,28

Gef. C 73,45 H 7,56 N 4,52

IR (KBr): Fehlen der Bande bei 1560 cm<sup>-1</sup>.

1-(4-Methoxybenzyl)-6.7-dimethoxy-2-methyl-1.2.3.4-tetrahydro-  
isochinolin-methojodid **64** .

---

15 ml Methyljodid wurden zu einer Lösung von 11 g **63** in 20 ml trockenem Aceton getropft und 1/2 Std. unter Rückfluß erhitzt. Innerhalb von 48 Std. kristallisierten derbe, farblose Rhomben aus.

Umkristallisation aus Methanol. Ausbeute 97 %.

Die Substanz war chromatographisch einheitlich.

Fp. 133-6°

$C_{21}H_{28}JNO_3$  (469,0)

Ber. C 53,72 H 5,97 N 2,98

Gef. C 53,92 H 6,09 N 3,08

UV (Methanol)  $\lambda_{\max}$  282 nm

(+)-O-Desmethyl-magnocurarin-bromid **19**

1-(4-Hydroxybenzyl)-6.7-dihydroxy-2-methyl-1.2.3.4-tetrahydro-  
isochinolin-bromid

---

Zur Entmethylierung wurden 9,0 g Verbindung **64** in 70 ml Bromwasserstoffsäure (D=1,49) unter Stickstoff 8 Std. in schwachem Sieden gehalten. Bereits während der Reaktion bildeten sich mehrere große, tafelförmige Kristalle an der Lösungsmitteloberfläche. Nach dem Abdampfen im Vakuum wurde aus Wasser umkristallisiert. Die Substanz war chromatographisch einheitlich.

Ausbeute 83 %.

Fp. 224°

$C_{18}H_{22}BrNO_3$  (380,3)

Ber. C 56,85 H 5,78 N 3,68

Gef. C 56,98 H 5,54 N 4,19

UV (Methanol/n HCl 9+1)  $\lambda_{\max}$  285 nm

Setzte man zur Entmethylierung nicht umkristallisierte Verbindung **64** ein, erhielt man ein schlecht kristallisierendes Methobromid. Versetzte man die gesättigte wässrige Lösung des Methobromids mit 10 %iger wässriger Kaliumjodidlösung, erhielt man das entsprechende gut kristallisierende Methojodid.

Umkristallisation aus Wasser. Farblose Prismen.

Fp. 242°

#### 4. Oxidationen mit Eisen-III-chlorid.

##### 4.1. Dehydro-isolaudanosolin-methochlorid 26 .

[2.3.9.10-tetrahydro-7H-dibenzo(d.e:g)-6-methyl-4.5-dihydro-chinolin-methochlorid].

---

1 g Isolaudanosolin-methobromid 18 wurde in 100 ml Wasser gelöst; mit 5 ml 1 molarer Eisen-III-chloridlösung erhielt man nach 12-stündiger Oxidation 340 mg eines grau-braunen amorphen Pulvers<sup>37)</sup>. Ausbeute roh 39 %.

Fp. 223-5° (Zers.)

C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>ClNO<sub>4</sub> (349,7)

UV (Methanol/n HCl 9+1)  $\lambda_{\max}$  259, 289, 323-5 nm

Dünnschichtchromatographie:

Die Substanz trennte sich in zwei intensitätsgleichen Zonen. hRf-Werte 21 und 14.

Aus Substanzmangel konnten keine Mikroanalysen und keine weiteren Spektren zur Identifizierung angefertigt werden. Die Maxima der UV-Absorption und die hRf-Werte des Chromatogrammes waren mit den von BLASCHKE<sup>37)</sup> angegebenen Werten identisch.

##### 4.2. Oxidation von O-Desmethyl-magnocurarin-bromid 19 .

---

1,2 g O-Desmethyl-magnocurarin-bromid 19 wurden in 100 ml Wasser (luftfrei) unter leichtem Erwärmen gelöst und mit 6,5 ml 1 molarer Eisen-III-chloridlösung versetzt. Nach BLASCHKE<sup>37)</sup> wurde zur Reduktion überschüssiger Fe-III-Ionen mit 5 ml schwefliger Säure versetzt und deren Überschuß nach einer Stunde im Vakuum abgezogen. Nach Einstellen der hellgrünen Lösung auf pH 4 mit verdünnter Natronlauge konnten die Dehydrierungsprodukte als Pikrate gefällt und abgetrennt werden. Ihre Zerlegung erfolgte in Aceton mit ätherischer Salzsäure. Es resultierten 254 mg eines grau-braunen Rohproduktes.

UV (Methanol/n HCl 9+1):  $\lambda_{\max}$  284, 325, 335 (sh) nm

Dünnschichtchromatographie:

- hRf-Werte 63 unbekannte Substanz  
52 O-Desmethyl-magnocurarin-bromid<sup>19</sup>  
38 Dehydroverbindung. Nach BLASCHKE<sup>37)</sup> die  
dimere parallel verknüpfte Verbindung  
vom Berbamin-Typ 33  
32 Dehydroverbindung, unbekannt<sup>37)</sup>.

4.3. Dehydro-laudanosolin-methochlorid 9

[1.2.9.10-tetrahydro-7H-dibenzo-(d.e:g)-6-methyl-4.5-dihydro-  
chinolin-methochlorid].

---

2 g Laudanosolin 8<sup>+</sup> in 100 ml Wasser wurden nach <sup>2)</sup> mit einer Lösung von 3,0 g Eisen-III-chlorid in 20 ml Wasser gemischt und 24 Std. bei 20° oxidiert. Nach Zugabe von 20 ml konzentrierter Salzsäure wurde im Vakuum auf 75 ml eingeeengt. Nach 72 Std. konnte ein gelb-brauner Niederschlag abgesaugt werden.

Ausbeute 255 mg.

Fp. 225° (Lit. Fp. 223)<sup>2)</sup>

C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>ClNO<sub>4</sub> (349,7)

UV (Methanol/n HCl 9+1):  $\lambda_{\max}$  285,308 nm.

Dünnschichtchromatographie:

hRf-Werte 24 und 18. Die Zonen waren intensitätsgleich. Vermutlich handelte es sich um die Racemattrennung<sup>2)</sup>.

---

<sup>+</sup> das Laudanosolin-methobromid war in unserem Arbeitskreis schon früher synthetisiert worden. Es wurde hier als Vergleichssubstanz eingesetzt.

## 5. Enzympräparationen<sup>+</sup>.

### 5.1. Phenoloxidase-Stammlösung.

Als Ausgangsmaterial zur Enzymgewinnung diente die Kartoffelsorte "Bintje". Die Aufarbeitung erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von KUBOWITZ<sup>63)64)</sup>.

Um Aktivitätsverluste zu vermeiden, wurden sämtliche Arbeiten bei Temperaturen zwischen 0 und 2° sowie unter Vermeidung jeglichen Kontaktes mit Metallgegenständen durchgeführt. Zur Verbesserung der Haltbarkeit der Enzym-Lösung erfolgte eine Lyophilisierung der dialysierten Fermentlösung.

#### Arbeitsgang:

Herstellung des Kartoffelpreßsaftes: Die Rindenteile der Kartoffeln wurden abgerieben, der Brei mit 180 ml Wasser pro Kilo Kartoffeln versetzt und abgepreßt.

1. Acetonfällung. Der Kartoffelpreßsaft wurde bis zu 37 Volumenprozent mit Aceton versetzt, der entstandene Niederschlag abgepreßt und verworfen.

2. Acetonfällung. Bei weiterem Acetonzusatz bis zu 55 Volumenprozent fiel ein Niederschlag aus, der das Enzym enthielt. Er wurde in der Tiefkühlzentrifuge bei 0 bis 1° abzentrifugiert, mit Wasser (1/30 des Preßsaftvolumens) extrahiert und abzentrifugiert.

1. Ammoniumsulfatfällung. Die Lösung wurde mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung bis zu einem Sättigungsgrad von 0,42 versetzt und der Niederschlag abzentrifugiert.

2. Ammoniumsulfatfällung. Das Zentrifugat wurde auf einen Sättigungsgrad von 0,68 gebracht und der Niederschlag, der das Enzym enthielt, abzentrifugiert. Er wurde in 1/30 des Preßsaftvolumens suspendiert und 48 Stunden bei 0° dialysiert. Durch Gefrier Trocknung des Filtrats erhielt man das Trockenferment.

---

<sup>+</sup> Herrn H.SANKOWSKI danke ich für Anleitung und Mitwirkung bei den Enzympräparationen.

Aktivitätsbestimmung<sup>24)</sup>

Stammlösung: 6 mg Trockenextrakt pro ml bidestillierten Wassers zeigten eine Aktivität von 60,6 Cresolase-Einheiten. Dies entsprach 10,1 Cresolase-Einheiten pro mg Trockensubstanz.

Zu den Oxidationsversuchen wurde ein Teil Stammlösung mit zwei Teilen Wasser (bidest.) verdünnt.

## 5.2. Laccase

Als Ausgangsmaterial stand ein Acetontrockenextrakt des chinesischen Lackbaumes (*Rhus vernicifera*) zur Verfügung. Der Trockenextrakt wurde angereichert und nach FRÖMMING<sup>21)</sup> aufgearbeitet. Die Enzymlösung war kräftig blau gefärbt. Zur Oxidation wurde sie unverdünnt verwendet.

## 5.3. Peroxidase

Es wurde eine Enzympräparation der Fa. BOEHRINGER SÖHNE, Mannheim, verwendet. Sie zeigte eine spezifische Aktivität von 38 E/mg<sup>65)</sup>. Zur Oxidation wurden 2mg Peroxidase in 20 ml Wasser (bidest.) gelöst.

## 6. Enzymatische Oxidation von (+)-Isolaudanosolin-methobromid 18

### 6.1. Manometrische Messung bei der Reaktion mit Phenoloxidase.

Der Sauerstoff wurde pro Zeiteinheit in  $\mu$ l gemessen. Die Meßkurven sind jeweils um die Werte der Autoxidation korrigiert. Die angegebenen Mengen verstehen sich pro Reaktionsansatz.

Pro Versuchsreihe wurden angesetzt:

- 3 Gefäße ohne Enzym, zur Verfolgung der Autoxidation.
- 3 Gefäße ohne Substrat, zur Verfolgung von Veränderungen im System Lösungsmittel/Enzym.
- 2 Wasserwerte, zur Korrektur von Luftdruck- und Temperaturschwankungen.
- 4 Oxidationsansätze: Enzym/Lösungsmittel/Substrat.

Reaktionstemperatur: 25°

pH 4,5

- 2 mg Isolaudanosolin-methobromid in  
2 ml Wasser bidest. gelöst,  
0,5 ml Phenoloxidaselösung.

Ablesungen nach: 5, 10, 30 Min., 1, 2, 3, 4, 6 Std.

Bemerkung: Die Lösung war nach 30 Sek. hellbraun und nach 5 Min. dunkelrot-braun gefärbt.

pH 5,8

- 2 mg Isolaudanosolin-methobromid in  
2 ml Citrat-Puffer n. Mc ILVAIN <sup>59)</sup>  
0,5 ml Phenoloxidaselösung

Ablesungen nach: 3, 5, 10, 30 Min., 1, 2, 3, 4, 6 Std.

Bemerkung: Die Lösung war nach 30 Sek. kräftig braun, nach 3 Min. schwarzbraun.

pH 7,2

2 mg Isolaudanosolin-methobromid in

2 ml Phosphat-Puffer gelöst,

0,5 ml Phenoloxidaselösung

Ablesungen nach: 3, 5, 10, 30 Min., 1, 2, 3, 4, 6 Std.

Bemerkung: Die Farbveränderung erfolgte über hellblau, violett nach dunkelbraun. Es bildete sich ein brauner Niederschlag, der nach EASTOE<sup>66)</sup> (S. 88) hydrolysiert wurde. Im Dünnschichtchromatogramm des Aufschlusses waren weder phenolische noch stickstoffhaltige Substanzen nachzuweisen.

## 6.2. Dünnschichtchromatographie.

Sorbens: Cellulose (Fertigplatten 20 x 20 cm, Fa.MERCK) Schichtdicke 0,1 mm

Kammersättigung: 1/2 Std. Die getrennt abgemessenen Fließmittelkomponenten wurden in der Kammer gemischt und ein Filtrierpapierstreifen 60 x 20 cm ringförmig eingelegt.

Fließmittel: n-Butanol/Eisessig/Wasser (40/10/50)

Laufhöhe: 10 cm, Laufzeit: ca. 3 Std.

Aufgetragene Menge pro Startpunkt: 20-25 µl.

Das Entwickeln der Chromatogramme mußte in Abwesenheit von Luftsauerstoff erfolgen, da häufig Folgeoxidationen auftraten, die im unteren hRf-Bereich durch Schwanzbildung sichtbar wurden. Dies ließ sich weitgehend durch Verwendung analysenreiner Lösungsmittel, Füllen der Kammern mit einem inerten Gas und Entwickeln der Platten im Dunkeln erreichen. Die Kammern wurden deshalb in Holzverkleidungen entsprechender Größe eingestellt.

Die frisch entwickelten Chromatogramme zeigten nahezu farblose Zonen, die sich während des Trocknens an der Luft rasch grünblau oder bräunlich färbten. Zum Vergleich der hRf-Werte untereinander war dies bedeutungslos. Wurden jedoch Chromatogramme zwecks nachfolgender Elution zur Spektrenaufnahme angefertigt, mußte das Trocknen im lichtgeschützten Exsikkator in Abwesenheit von Luftsauerstoff erfolgen.

## Detektion

1. Stickstoffhaltige Verbindungen mit DRAGENDORFF's Reagens mod. nach THIESS<sup>67)</sup>. Vor Gebrauch wurde wie folgt verdünnt: Stammlösung 1 Teil,  
Essigester 24 Teile,  
Eisessig 10 Teile.  
Nachbehandlung: 0,1n Schwefelsäure.
2. Phenole mit Echtblausalz BB<sup>67)</sup>  
Vor Gebrauch wurden 0,5 g Echtblausalz BB in 50 ml Methanol 50 %ig gelöst.  
Nachbehandlung: 0,1n Natronlauge.

## Phenoloxidase

4 mg Isolaudanosolin-methobromid in  
4 ml Lösungsmittel  
1,0 ml Phenoloxidaselösung

Lösungsmittel: Wasser, luftfrei  
Citrat-Puffer pH 5,8  
Phosphat-Puffer pH 7,2

Chromatogramme nach: 1, 5, 15 Min., 1, 2, 3, 24, 200 Std.

Zur Inhibierung des Enzyms wurden jeweils 0,5 ml Substratlösung mit 0,5 ml Methanol versetzt.

## Laccase

4 mg Isolaudanosolin-methobromid in  
3 ml Lösungsmittel  
2,0 ml Laccaselösung

Lösungsmittel: Wasser, luftfrei  
Citrat-Puffer pH 5,8  
Phosphat-Puffer pH 7,2

Chromatogramme nach: 15, 30 Min., 1, 3, 24, 200 Std.

Zur Inhibierung des Enzyms wurden 0,5 ml Substratlösung mit 0,5 ml 0,1n Salzsäure versetzt.

Bemerkung: Die nach 30 Min. noch hellbraune Lösung war nach 24 Std. dunkelbraun. Keine Fällung.

#### Peroxidase/Wasserstoffperoxid

4 mg Isolaudanosolin-methobromid in

4 ml Lösungsmittel

1,0 ml Peroxidaselösung/0,1 ml Wasserstoffperoxid 3 %

Lösungsmittel: Wasser, luftfrei

Citrat-Puffer pH 5,8

Phosphat-Puffer pH 7,2

Chromatogramme nach: 30 Sek., 5, 30 Min., 1, 3, 24 Std.

Zur Inhibierung des Enzyms wurden jeweils 0,5 ml Substratlösung mit 0,5 ml Methanol versetzt.

Bemerkung: Die bei pH 4,5 nach 3 Min. erreichte dunkelbraune Färbung zeigte sich bei pH 7,2 bereits nach 30 Sek.

### 6.3. UV-Spektroskopie

Die Substratlösungen wurden wie zur Dünnschichtchromatographie angesetzt. Spektrenaufnahmen erfolgten, nach Inaktivierung des Enzyms, wie folgt:

1. Messung der gesamten Reaktionslösung nach den angegebenen Zeiteinheiten.
2. Nach Elution bestimmter DC-Zonen (jeweils 10 Zonen gleicher  $R_f$ -Werte pro Spektrum). Die Detektion erfolgte im UV-Licht. Die zur Elution vorgesehenen Zonen wurden abgedeckt.

#### Phenoloxidase

1. Gesamtlösung nach: 5, 15 Min., 1,3, 24, 200 Std.

0,5 ml Substratlösung wurden mit 5,0 ml n HCl/Methanol (1+9) gemischt.

2. Dünnschichtchromatographie nach 5 Min. Die Zonen  $R_f$  14 und 21 wurden mit je 4 ml n HCl/Methanol (1+9) eluiert.

### Laccase

1. Gesamtlösung nach 15, 30 Min., 1, 3, 24, 200 Std.  
0,5 ml Substratlösung wurden mit 5,0 ml 0,1 n HCl  
gemischt. <sup>+</sup>
2. Dünnschichtchromatographie nach 1 Std. Die Zonen  
hRf 14 und 21 wurden mit je 4 ml 0,1 n HCl eluiert.

### Peroxidase/Wasserstoffperoxid

1. Gesamtlösung nach 30 Sek., 5, 30 Min., 1, 3, 24 Std.  
0,5 ml Substratlösung wurden mit 5,0 ml n HCl/Methanol  
(1+9) gemischt.
2. Dünnschichtchromatographie nach 5 Min. Die Zonen  
hRf 14 und 21 wurden mit je 4,0 ml n HCl/Methanol  
(1+9) eluiert.

---

<sup>+</sup> Die Laccase koagulierte in Methanol unter Bildung eines  
amorphen Niederschlages, der sich schlecht entfernen ließ.

7. Enzymatische Oxidation von (+)-O-Desmethyl-magnocurarin-bromid 19

Wurde zur Oxidation 3-4 Tage alte Phenoloxidase-Stammlösung verwendet, war bereits ein deutlicher Aktivitätsverlust zu verzeichnen. Außerdem fiel während der Oxidationsreaktionen ein dunkelbrauner Niederschlag aus, der in Anlehnung an das Verfahren von EASTOE<sup>66)</sup> hydrolysiert wurde:

10 mg Niederschlag wurden in 1 ml Salzsäure (10 %) suspendiert und, in einer Ampulle eingeschmolzen, 48 Std. auf 105° erhitzt. Anschließend entfernte man die Säure bei Raumtemperatur im Vakuum über Phosphorpentoxid und Natriumhydroxid. Das Hydrolysat wurde in 1 ml n HCl/Methanol (1+9) aufgenommen, filtriert und chromatographiert. Die Detektion mit den Reagentien DRAGENDORFF-THIESS und Echtblausalz BB verlief negativ.

7.1. Manometrische Messung bei der Reaktion mit Phenoloxidase.

Die angegebenen Mengen verstehen sich pro Reaktionsansatz.

Pro Versuchsreihe wurden angesetzt:

2 Gefäße ohne Enzym, zur Verfolgung der Autoxidation.

2 Gefäße ohne Substrat, zur Verfolgung von Veränderungen im System Enzym/Lösungsmittel

2 Wasserwerte, zur Korrektur von Luftdruck- und Temperaturschwankungen.

2 Gefäße: Enzym/Überträgersubstanz

4 Oxidationsansätze.

pH 4,5   pH 5,8   pH 7,2

ohne Überträgersubstanzen.

2 mg O-Desmethyl-magnocurarin-bromid in

2,0 ml Lösungsmittel

0,5 ml Phenoloxidaselösung

Lösungsmittel: Wasser, luftfrei

Citrat-Puffer pH 5,8

Phosphat-Puffer pH 7,2

pH 4,5 5,8 7,2

mit Überträgersubstanzen

2 mg O-Desmethyl-magnocurarin-bromid in  
1,0 ml Lösungsmittel  
0,5 mg p-Cumarsäure in 1,0 ml Lösungsmittel  
0,5 ml Phenoloxidaselösung

2 mg O-Desmethyl-magnocurarin-bromid in  
1,0 ml Lösungsmittel  
0,5 mg Kaffeesäure in 1,0 ml Lösungsmittel  
0,5 ml Phenoloxidaselösung.

Lösungsmittel: Wasser, luftfrei  
Citrat-Puffer pH 5,8  
Phosphat-Puffer pH 7,2

7.2. Dünnschichtchromatographie

Allgemeine Bedingungen wie in Kap. 6.2.

Fließmittel: n-Butanol/Wasser/Eisessig (4/5/1)

Phenoloxidase

ohne Überträgersubstanzen, pH 4,5 5,8 7,2

4 mg O-Desmethyl-magnocurarin-bromid in  
4,0 ml Lösungsmittel  
1,0 ml Phenoloxidaselösung

Lösungsmittel: Wasser, luftfrei  
Citrat-Puffer pH 5,8  
Phosphat-Puffer pH 7,2

Chromatogramme nach: 5, 30 Min., 2, 5, 24 Std.

Zur Inhibierung des Enzyms wurden 0,5 ml Substratlösung mit  
0,5 ml Methanol versetzt.

Zusatz von Ascorbinsäure

In einem 2. Ansatz wurden zur Substratlösung 100 mg Ascorbin-  
säure gefügt.

mit Überträgersubstanzen, pH 4,5 5,8 7,2

4 mg O-Desmethyl-magnocurarin-bromid in

3,0 ml Lösungsmittel

1 mg p-Cumarsäure in 1,0 ml Lösungsmittel

1,0 ml Phenoloxidaselösung

4 mg O-Desmethyl-magnocurarin-bromid in

3,0 ml Lösungsmittel

1 mg Kaffeesäure gelöst in 1,0 ml Lösungsmittel

1,0 ml Phenoloxidaselösung

Lösungsmittel: Wasser, luftfrei

Citrat-Puffer pH 5,8

Phosphat-Puffer pH 7,2

Chromatogramm nach: 5, 30 Min., 2, 5, 24 Std.

Inhibierung des Enzyms wie oben.

#### Laccase

pH 4,5 5,8 7,2

8 mg O-Desmethyl-magnocurarin-bromid in

4,0 ml Lösungsmittel

2 ml Laccaselösung

Lösungsmittel wie oben.

Chromatogramme nach: 30 Min., 1, 3, 7, 24, 72 Std.

Bemerkung: Während bei pH 4,5 und 5,8 innerhalb von 24 Std. keine Farbbänderung eintrat, zeigte sich bei pH 7,2 nach 30 Min. Braunfärbung.

Zur Inhibierung des Enzyms wurden 0,5 ml Substratlösung mit 0,1 ml n Salzsäure versetzt.

#### Peroxidase/Wasserstoffperoxid

pH 4,5 5,8 7,2

4 mg O-Desmethyl-magnocurarin-bromid in

4,0 ml Lösungsmittel

1 ml Peroxidaselösung/0,1 ml Wasserstoffperoxid 3 %

Lösungsmittel wie oben.

Chromatogramme nach: 15, 30 Sek., 3, 15, 60 Min.

Zur Inhibierung des Enzyms wurden 0,5 ml Substratlösung mit 0,5 ml Methanol versetzt.

#### Peroxidase/Dihydroxyfumarsäure

4 mg O-Desmethyl-magnocurarin-bromid in

4,0 ml Lösungsmittel

1 mg bzw. 10 mg Dihydroxyfumarsäure

1 ml Peroxidaselösung

Lösungsmittel, Chromatogramme und Inhibierung wie oben.

Dihydroxyfumarsäure ist sauerstoffempfindlich und decarboxyliert leicht, sie wurde vor Gebrauch umkristallisiert. 1 g Substanz wurde in 20 ml Aceton gelöst und filtriert, 12 ml Wasser (bidest.) wurden zugegeben und bei  $-15^{\circ}$  über Nacht stehen gelassen und die ausgeschiedenen Kristalle im Vakuum mit Blaugel getrocknet Fp.  $151^{\circ}$ .

### 7.3. UV-Spektroskopie

Die Substratlösungen wurden wie zur Dünnschichtchromatographie angesetzt.

Spektrenaufnahmen erfolgten, nach Inaktivierung des Enzyms, wie folgt:

1. Messung der gesamten Reaktionslösung nach den genannten Zeiteinheiten.
2. Nach Elution bestimmter DC-Zonen (jeweils 10 Zonen pro Spektrum). Detektiert wurde im UV-Licht. Die zur Elution vorgesehenen Zonen wurden abgedeckt.

### Phenoloxidase

1. Gesamtlösung nach: 5, 30 Min., 2, 5, 24 Std.  
0,5 ml Substratlösung wurden mit 5,0 ml n HCl/Methanol (1+9) gemischt.
2. Dünnschichtchromatographie pH 4,5:  
Nach 2 Std. wurden die Zonen hRf 18 und 24 mit je 4,0 ml n HCl/Methanol (1+9) eluiert.

### Laccase

Es wurden die Gesamtlösungen bei den pH-Werten 4,5 5,8 und 7,2 nach 30 Min., 2, 5, 24 Std. aufgenommen.  
0,5 ml Substratlösung wurden mit 1,0 ml 0,1 n Salzsäure gemischt.

### Peroxidase/Wasserstoffperoxid

Gesamtlösungen bei pH 4,5 5,8 7,2 nach 30 Sek., 5, 30 Min.  
0,5 ml Substratlösung wurden mit 5,0 ml n HCl/Methanol (1+9) gemischt.

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob die Enzyme Phenoloxi-dase, Laccase und Peroxidase in der Lage sind, die Oxidation der 1-Benzyl-tetrahydro-isochinoline Isolaudanosolin-methobromid und O-Desmethyl-magnocurararin-bromid zu katalysieren. Phenoldehydrie-rungen durch die genannten Enzyme sind bekannt und ihre biosynthe-tische Beteiligung bei der Alkaloidsynthese in der Pflanzenzelle wahrscheinlich. Die Relevanz dieser Hypothese wurde in vitro gete-stet. Das O-Desmethyl-magnocurararin-bromid bot ferner die Möglich-keit zur Untersuchung von enzymkatalysierten Hydroxylierungsreak-tionen.

Die für diese Versuchsreihen benötigten quaternären Verbindungen Isolaudanosolin-methobromid und O-Desmethyl-magnocurararin-bro-mid wurden zum Teil nach konventionellen Methoden synthetisiert, zum Teil wurden neue Wege verwendet. Dadurch war es möglich in zwei Fällen, Zwischenstufen, die bisher in der Literatur<sup>37)</sup> als Öl beschrieben sind, kristallin zu erhalten. Es handelt sich hierbei um das 1-(3.4-Dimethoxybenzyl)-5.6-dimethoxy-2-methyl-1.2.3.4-tetra-hydro-isochinolin<sup>54</sup> und das 1-(4-Methoxybenzyl)-6.7-dimethoxy-2-methyl-1.2.3.4-tetrahydro-isochinolin<sup>63</sup> .

Als Oxidationsenzyme dienten Phenoloxidase, Laccase und Peroxidase/Wasserstoffperoxid. Die Reaktionen wurden bei verschiedenen pH-Wer-ten (4,5 5,8 7,2) und zum Teil in Gegenwart sogenannter Über-trägersubstanzen durchgeführt. Zur Untersuchung der Reaktionspro-dukte wurden manometrische, dünnschichtchromatographische und UV-spektroskopische Methoden herangezogen.

In den Phenoloxidase- und Laccase-katalysierten Ansätzen des Isolau-danosolin-methobromids wurde neben anderen ein Reaktionsprodukt er-halten, das dünnschichtchromatographisch und UV-spektroskopisch mit dem Aporphin<sup>26</sup> (Dehydro-isolaudanosolin-methobromid) übereinstimmt.

In dem Peroxidase/Wasserstoffperoxid-katalysierten Ansatz sprechen die dünnschichtchromatographischen Werte ebenfalls für eine Dehy-

drierung zu dem Aporphin<sup>26</sup>. Die UV-spektroskopische Messung läßt aufgrund der hypsochromen Verschiebung des Hauptmaximums des Iso-  
laudanosolin-methobromids auch die Bildung des stärker verdrillten  
Aporphins<sup>26a</sup> möglich erscheinen.

O-Desmethyl-magnocurarin-bromid wurde in Gegenwart von Phenoloxi-  
dase zu einer Verbindung umgesetzt, die dünn-schichtchromatographisch  
und UV-spektroskopisch identisch war mit dem Aporphin 9 (Dehydro-  
laudanosolin-methobromid). Demnach hatte eine Hydroxylierung des  
monophenolischen Benzylteils zum Laudanosolin-methobromid 8 statt-  
gefunden, das anschließend zum Aporphin 9 oxidiert wurde. Die für  
eine Hydroxylierung erforderliche Induktionszeit konnte durch Zu-  
satz von Überträgersubstanzen verkürzt (p-Cumarsäure) bzw. aufgeho-  
ben (Kaffeensäure) werden.

Der Beweis der Hydroxylierung gelang durch Zusatz von Ascorbinsäure  
zur Substratlösung. Das Hydroxylierungsprodukt Laudanosolin-metho-  
bromid konnte abgefangen und dünn-schichtchromatographisch nachge-  
wiesen werden. Das Eluat mehrerer DC-Zonen wurde oxidiert und er-  
neut chromatographiert. Das Chromatogramm zeigte nun die für das  
Aporphin 9 charakteristischen hRf-Werte 18 und 24.

Weiterhin konnte bewiesen werden, daß die durch Phenoloxidase kataly-  
sierten Dehydrierungen über Chinonzwischenstufen verlaufen. Diese  
wurden durch die Ascorbinsäure laufend zu Laudanosolin-methobromid  
reduziert und somit die Aporphinbildung verhindert.

Laccase vermochte O-Desmethyl-magnocurarin-bromid bei pH 4,5 nicht  
zu oxidieren. Bei pH 5,8 und 7,2 wurden Reaktionsprodukte erhalten,  
deren Strukturen unbekannt blieben. Es kann jedoch mit Sicherheit  
gesagt werden, daß die dimere parallel verknüpfte Verbindung 33,  
die bei der Oxidation von O-Desmethyl-magnocurarin-bromid mit Ei-  
sen-III-chloridlösung erhalten worden war, bei Anwesenheit von  
Laccase nicht entstand.

Bei der Dehydrierung des O-Desmethyl-magnocurarin-bromids mit Per-  
oxidase/Wasserstoffperoxid wurde die Entstehung von fünf Verbin-

dungen nachgewiesen, die dünnschichtchromatographisch und UV-spektroskopisch nicht identisch waren, mit solchen, die bei der Oxidation mit Phenoloxidase und Laccase beobachtet wurden. Auch hier konnte die dimere Verbindung 33 nicht nachgewiesen werden. Durch Zusatz von Dihydroxyfumarsäure zur Substratlösung konnte (in Abwesenheit von Wasserstoffperoxid) keine Hydroxylierung zum Laudanosolin-methobromid erzielt werden.

Die dargelegten Ergebnisse beweisen die Fähigkeit der genannten Enzyme, 1-Benzyl-tetrahydro-isochinoline zu oxidieren. Sie beweisen ferner die Fähigkeit der Phenoloxidase Hydroxylierungen solcher Verbindungen zu katalysieren. Es ist nicht auszuschließen, daß die in vitro gewonnenen Ergebnisse auch in der Pflanzenzelle analog ablaufen können.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) C.SCHÖPF und K.THIERFELDER, Liebigs Ann.Chem.  
497,22 (1932)
- 2) B.FRANCK und G.SCHLINGLOFF, Liebigs Ann.Chem.  
659,123 (1962)
- 3) R.ROBINSON und S.SUGASAWA, J.chem.Soc.(London),  
1932, 789
- 4) B.FRANCK und G.BLASCHKE, Liebigs Ann.Chem.  
668,145 (1963)
- 5) A.R.BATTERSBY, J.chem.Soc.(London) 1968,210
- 6) H.KONDO und T.KONDO, J.prakt.Chem. 126,38 (1930)
- 7) E.FUJITAN und T.TOMIMATSU, J.pharm.Soc.Japan  
79,1082 (1959)
- 8) ibid. 79,1252 (1959)
- 9) R.G.COOKE und H.F.HAYNES, Austr.J.Chem. 7,99 (1954),  
C.A.1955 3212
- 10) D.H.R.BARTON, G.W.KIRBY, W.STEGLICH, G.M.THOMAS,  
A.R.BATTERSBY, T.H.DOBSON und H.RAMUZ,  
J.chem.Soc. (London) 1965 2423
- 11) R.PUMMERER, Ber.dtsch.chem.Ges. 52,1403 (1919)
- 12) D.H.R.BARTON, A.M.DEFLORIN und O.E.EDWARDS,  
J.chem.Soc. (London) 1956 530
- 13) W.W.WESTERFIELD und C.LOWE, J.biol.Chem. 145,463 (1942)
- 14) E.BOURQUELOT und L.MARCHADIER C.r.Acad.Sci.  
138,1432 (1904)
- 15) H.ERDTMAN und C.A.WACHTMEISTER in: Festschrift  
Prof.Dr.A.STOLL, Birkhäuser-Verlag, Basel 1957
- 16) A.R.BATTERSBY, R.BINKS, D.M.FOULKES, R.J.FRANCIS,  
D.J.Mc CALDIN und H.RAMUZ, Proc.chem.Soc. (London)  
1963 203

- 17) D.NEUBAUER, Planta med. (Stuttgart) 12,310 (1964)
- 18) F.R.STERNITZ und H.RAPOPORT, Nature (London) 189,310 (1961)
- 19) F.R.STERNITZ und J.N.SEIBER, J.org.Chemistry 31,2925 (1966)
- 20) G.SCHENCK, K.H.FRÖMMING, W.WIECHULA und E.SCHWALB, Arch.Pharm. 293,312 (1960)
- 21) K.-H.FRÖMMING, Arch.Pharm. 300,977 (1967)
- 22) T.KAMETANI, S.TAKANO und T.KOBARI, J.chem.Soc. (London) 1969,9
- 23) K.-H.FRÖMMING, Pharmaz.Ztg. 105,27 (1960)
- 24) M.GRAUBARD und J.M.NELSON, J.biol.Chem. 112,135 (1935/6)
- 25) T.NAKAMURA, Biochem.biophys.Acta, 30,44 (1958)
- 26) A.RIEKER, H.KAUFMANN, D.BRÜCK, R.WORKMAN und E.MÜLLER, Tetrahedron 24, I 109 (1968)
- 27) E.E.CONN in: Biochemistry of Phenolic Compounds, Academic Press London and N.Y. 1964 S. 416
- 28) D.KEILIN und P.J.G.MANN, Proc.Roy.Soc.London B 125,187 (1938)
- 29) M.F.MALETTE und C.R.DAWSON, Arch.Biochem.23,29 (1949)
- 30) G.A.HAMILTON in: "Advances in Enzymologie", Interscience Publishers, Inc. N.Y. 1969 Vol. 32 p. 66
- 31) G.FARHAEUS und H.LJUNGGREN, Biochim.Biophys.Acta, 46,22 (1961)
- 32) H.THEORELL in: Summer and Myrbäck, "The Enzymes", Academic Press N.Y. 1951 Vo. 2 p. 397
- 33) K.MYRBÄCK in: "Fermente, Hormone, Vitamine", Hrsg. R.Ammon und W.Dirschel, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1959, Band I S. 512

- 34) B.C.SAUNDERS, A.G.HOLMES-SIEDLE und B.P.STARK  
in "Peroxidase", Butterworths London 1964
- 35) B.C.SAUNDERS und P.J.G.MANN, J.chem.Soc. (London)  
1940,769
- 36) B.C.SAUNDERS und G.H.R.WATSON, Biochem.J. 46,629 (1950)
- 37) G.BLASCHKE, Dissertation, Göttingen 1964
- 38) K.-H.FRÖMMING und K.DRESCHER, Arch.Pharm. 302,9 (1969)
- 39) A.H.JACKSON, J.A.MARTIN, J.chem.Soc.(London)  
(C) 2222 (1966)
- 40) A.SCOTT, Quartley Rev.19 (1965)
- 41) L.F.TIETZE, Dissertation Kiel 1968
- 42) G.BLASCHKE, Arch.Pharm., 303,358 (1970)
- 43) J.BAXTER, L.T.ALLAN und G.A.SWAN, J.chem.Soc.(London)  
1965,3645
- 44) Y.INUBUSHI, Y.AOYAGI und M.MATSUO, Tetrahedron Letters  
28, 2363 (1969)
- 45) T.KAMETANI und I.NOGUCHI, J.chem.Soc.(London) 1968,447
- 46) E.SPÄTH, K.RIEDL und G.KUBICZEK, Mh.Chem. 79,72 (1948)
- 47) J.FINKELSTEIN, J.Amer.chem.Soc. 73,550 (1951)
- 48) R.F.NYSTROM und W.G.BROWN, J.Amer.chem.Soc. 70,3738 (1948)
- 49) K.H.SLOTTA und G.SZYSKA, J.prakt.Chem.N.F. 137, 346 (1933)
- 50) R.GREWE und H.FISCHER, Chem.Ber. 96, 1520 (1963)
- 51) R.ROBINSON und T.KITASATO, J.chem.Soc.(London) 1932,785
- 52) J.F.W.Mc OMIE, M.L.WATTS und D.E.WEST, Tetrahedron  
24 (Nr.5) 2289 (1968)
- 53) M.SHAMMA, Experimentia (Basel) 16,484 (1960)
- 54) I.KIKKAWA, J.pharm.Soc.Japan (Yakugakuzasshi)  
81,732 (1961), ref.C.A. 55, 26005 (1961)

- 55) E.STAHL, "Dünnschichtchromatographie", Springer Verlag, Berlin 1967, S. 851
- 56) *ibid.* S. 837
- 57) R.MURNIER, Bull.Soc.chim.biol. 35,1225 (1953)
- 58) F.DICKENS in: "Methoden der Fermentforschung"  
Hrsg. B.Bamann und H.Myrbäck, Georg Thieme Verlag Leipzig 1941, Bd. I, S. 985
- 59) M.STEINER in: "Methoden der Fermentforschung"  
Hrsg. B.Bamann und H.Myrbäck, Georg Thieme Verlag Leipzig 1941, Bd. I, S. 780, 786
- 60) E.SPAETH und M.LANG, Mh.Chem. 42,278 (1921)
- 61) T.KAMETANI, Chem.und Pharm.Bull.Japan,  
Vol. 16, Nr. 5, S. 909 (1968)
- 62) H.KONDO und T.KONDO, J.prakt.Chem. 126,24 (1930)
- 63) F.KUBOWITZ, Biochem.Ztg. 292,221 (1937)
- 64) *ibid.* 299,32 (1938)
- 65) BOEHRINGER SÖHNE, Mannheim, Biochemica Information,  
Peroxidase (1967)
- 66) J.E.EASTOE, Biochem.J. 61,589 (1955)
- 67) E.STAHL, "Dünnschichtchromatographie", Springer Verlag, Berlin 1967, S. 829
- 68) D.R.BUHLER, H.S.MASON, Arch.Biochem.Biophys. 92,424 (1961)
- 69) H.S.MASON, I.ONOPRIENKO, K.YASUNOBU und D.BUHLER,  
J.Amer.chem.Soc. 79,5578 (1957)



## Lebenslauf

Am 11.4.1940 wurde ich als Tochter des Oberforstmeisters Kurt Sommer und seiner Ehefrau, der Auslandskorrespondentin Marianne, geb. Entress, in Gießen/L geboren.

Ab Herbst 1946 besuchte ich die Volksschule in Gersfeld/Rhön, später in Wiesbaden. Im Frühjahr 1951 wurde ich in die Helene Lange-Schule, Realgymnasium, Wiesbaden, aufgenommen. Seit dem Frühjahr 1958 besuchte ich den Naturwissenschaftlichen Zweig des Aufbaugymnasiums Bensheim/Bergstr. und legte dort am 4.3.1960 die Reifeprüfung ab.

Meine pharmazeutische Ausbildung begann ich im April 1960 als Praktikantin der Kreuz-Apotheke in Wiesbaden. Dort bestand ich am 28.2.1962 das Pharmazeutische Vorexamen. Im Sommersemester 1962 begann ich mit dem Pharmaziestudium an der Philipps-Universität in Marburg/L und beendete es am 15.7.1965 mit dem Pharmazeutischen Staatsexamen.

Nach meiner Kandidatenzeit in der Stadt-Apotheke Bad Schwartau erhielt ich am 1.8.1966 die Approbation als Apotheker.

Am 1.10.1967 begann ich mit der Doktorarbeit am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin unter Anleitung von Herrn Prof.Dr.K.-H.Frömming. Gleichzeitig wurde ich als Wissenschaftliche Hilfsassistentin angestellt. Seit dem 19.2.1970 bin ich als Wissenschaftliche Assistentin tätig.

Ich bin mit dem Dipl.-Chemiker Dr. Hans Köhne verheiratet.





